

Untersuchungen zur Enzym-Ligand- Wechselwirkung bei tierischen Lipoxygenasen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Chemiker Matthias Walther
geboren am 20. Juni 1970 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann
 2. Prof. Dr. Hartmut Kühn
 3. Prof. Dr. Ivo Feußner

eingereicht: 25.02.2003

Datum der Promotion: 28.05.2003

Zusammenfassung

Lipoxygenasen sind nichthämeisenhaltige Dioxygenasen, die die Bildung von Hydroperoxiden aus molekularem Sauerstoff und mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren. Diese Reaktion verläuft mit hoher Positions- und Stereospezifität. Entsprechend ihrer Eigenschaft, Arachidonsäure an unterschiedlichen Positionen zu oxygenieren, unterscheidet man bei Säugetieren 5-, 8-, 12- und 15-Lipoxygenasen. Die mechanistischen Ursachen dieser unterschiedlichen Positionsspezifität sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Als Grundlage gelten spezifische Enzym-Substrat-Wechselwirkungen, zu denen auch die Orientierung der Substratfettsäure im aktiven Zentrum der Lipoxygenase gehört.

Normalerweise binden 12/15-Lipoxygenasen Fettsäuren mit dem hydrophoben Methylenende in der Substratbindungstasche. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine 15-Lipoxygenase katalysierte 5-Lipoxygenierung als Folge inverser Substratbindung (Bindung mit der Carboxylgruppe im aktiven Zentrum) nachgewiesen werden, obwohl strukturell eine 15-Lipoxygenierung möglich war. Hierzu ist eine gleichzeitige Modifikation beider Enden der Fettsäure nötig. Im Gegensatz dazu ist bei der humanen 5-Lipoxygenase keine inverse Substratbindung möglich. Die Positionsspezifität dieses Enzyms geht also nicht auf eine entgegengesetzte Orientierung des Substrats im Vergleich zu 12/15-Lipoxygenasen zurück, sondern auf eine größere Substratbindungstasche (Volumenhypothese).

Versuche mit dem Lipoxygenasehemmstoff Ebselen ergaben unterschiedliche Mechanismen für die Hemmung verschiedener Enzymzustände. Die Lipoxygenase im Grundzustand, d. h. mit einem zweiwertigen Eisen, wird durch Ebselen irreversibel nach einem nicht-kompetitiven Mechanismus gehemmt. Dies geschieht durch kovalente Bindung an die Lipoxygenase und Veränderung der Eisenligandensphäre. Das aktive Enzym mit einem dreiwertigen Eisen wird nur noch kompetitiv durch Ebselen gehemmt.

Zu der Aufklärung der Beteiligung der N-terminalen Enzymdomäne an der Membranbindung der Kaninchen-Retikulozyten 15-Lipoxygenase wurde eine Trunktationsmutante exprimiert, die nur die C-terminale katalytische Domäne enthielt. Diese Mutante war enzymatisch aktiv und vermochte noch an Biomembranen zu binden. Durch ortsgerichtete Mutagenese konnten verschiedene oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren sowohl in der N- als auch in der C-terminalen Domäne identifiziert werden, die für die Membranbindung entscheidend sind. Die Kaninchen-Retikulozyten 15-Lipoxygenase bindet also hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen an Biomembranen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Vorkommen und Nomenklatur von Lipoxygenasen	1
1.2	Biologische Bedeutung der Lipoxygenasen.....	5
1.2.1	Entzündungsreaktion und Asthma	5
1.2.2	Zellreifung und Differenzierung	7
1.2.3	Atherosklerose	8
1.2.4	Karzinogenese	10
1.2.5	Weitere Funktionen.....	11
1.3	Die Lipoxygenasereaktion	12
1.4	Regulation der zellulären Lipoxygenaseaktivität.....	16
1.5	Struktur der Lipoxygenasen	18
1.5.1	Primärstruktur	18
1.5.2	Kristallstruktur der Kaninchen-Retikulozyten 15-Lipoxygenase	18
1.5.3	Substratbindung und Determinanten der Positionsspezifität	22
1.5.4	Hypothesen für die Ursachen der Positionsspezifität von Lipoxygenasen.....	24
1.6	Lipoxygenase-Hemmstoffe	28
1.6.1	Eigenschaften von Ebselen	28
1.7	Ziele der Arbeit	29
2	MATERIALIEN UND METHODEN	31
2.1	Materialien	31
2.1.1	Chemikalien und Biochemikalien	31
2.1.2	Nährmedien, Puffer und Lösungen	33
2.1.3	Enzyme und Kits	34
2.1.4	Plasmide und Oligonukleotide	34
2.1.5	Bakterienstämme und Zelllinien	35
2.2	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.1	Polymerasekettenreaktion	36
2.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese.....	36
2.3	Expression der rekombinanten Lipoxygenase.....	37
2.3.1	Ligation der 15-LOX-cDNA in pQE-9	37
2.3.2	Transformation des 15-LOX-pQE-9 Plasmids und Expression des Enzyms	37
2.3.3	Reinigung der (His) ₆ -15-LOX über Nickel-Agarose	38
2.3.4	Weitere Reinigung der (His) ₆ -15-LOX über Q-Sepharose.....	38
2.3.5	Einführung von Mutanten in das His-tag Expressionssystem	39
2.3.6	Expression der 5-LOX	39
2.3.7	Glyzerinkulturen	40
2.4	Analytische Methoden	40
2.4.1	Messung der Lipoxygenaseaktivität.....	40
2.4.1.1	Photometrischer Aktivitätsassay.....	40
2.4.1.2	HPLC Aktivitätsassay.....	41
2.4.2	Produktanalyse	42

2.4.2.1	Normalphasen-HPLC	42
2.4.2.2	Chiralphasen-HPLC	42
2.4.2.3	Massenspektrometrie	43
2.4.3	Proteinbestimmung	44
2.4.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.4.5	Western Blot	44
2.5	Bestimmung von Enzymeigenschaften	45
2.5.1	Kinetische Konstanten K_M und V_{Max}	45
2.5.2	pH-Optimum	45
2.5.3	Substratspezifität	45
2.6	Untersuchungen mit Hemmstoffen	46
2.6.1	Bestimmung von IC_{50} -Werten	46
2.6.2	Untersuchungen zum Hemmmechanismus von Ebselen	46
2.6.3	Bestimmung der Ebselen/LOX-Stöchiometrie und der Bindungsverhältnisse	47
2.6.4	Dialyse	47
2.6.5	Untersuchungen zur Strukturaufklärung	47
2.6.5.1	Grundlagen der Röntgenabsorptionsspektroskopie	47
2.6.5.2	Durchführung der EXAFS-Messungen	49
2.6.5.3	Datenreduktion und Auswertung der EXAFS-Spektren	50
2.6.6	Modellierung der Hemmkinetik	51
2.7	Untersuchungen zu Membranbindungseigenschaften der 15-LOX	51
2.7.1	Membranbindungsassay	51
2.7.2	Umsatz von biologischen Membranen	52
2.7.3	Bestimmung der Membranoxygenaseaktivität über Quantifizierung der Freisetzung luminaler Proteine	52
2.8	Verschiedene Methoden	53
2.8.1	Modellierung der Struktur der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX	53
2.8.2	Anfertigen von Sequenzvergleichen und Erstellung von Restriktionskarten	54
2.8.3	Darstellung von Diazomethan und Veresterung von Carboxylgruppen	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Enzymreinigung und Charakterisierung	55
3.1.1	Die Reinigung der $(His)_6$ -15-LOX führt zu einem mehr als 95% reinen Enzym	55
3.1.2	Die Wildtyp- $(His)_6$ -15-LOX hat die gleichen enzymatischen Eigenschaften, wie das native Enzym	57
3.2	Untersuchungen zum aktiven Zentrum der 15-LOX	58
3.2.1	Enzym-Substrat-Wechselwirkungen	58
3.2.1.1	Die Positions determinanten der Fettsäureoxygenierung bleiben bei der $(His)_6$ -15-LOX erhalten	58
3.2.1.2	Modifizierung des Substrats führt zu einer veränderten Positionsspezifität	59
3.2.1.3	Inverse Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX erfolgt nach simultaner Modifikation des Carboxyl- und des Methylterminus	63
3.2.1.4	Untersuchungen mit Positionsspezifität verändernden Enzymmutanten bestätigen die inverse Substratbindung	66
3.2.1.5	Bei der humanen 5-LOX ist keine inverse Substratbindung möglich	69
3.2.2	Enzym-Hemmstoff-Wechselwirkungen	73
3.2.2.1	Die katalytisch inaktive Eisen[II]-LOX wird durch Ebselen irreversibel gehemmt	74
3.2.2.2	Ebselen bindet kovalent an die 15-LOX	75
3.2.2.3	Ebselen verändert die Eisenligandensphäre der 15-LOX	78
3.2.2.4	Die katalytisch aktive Eisen[III]-LOX wird durch Ebselen kompetitiv gehemmt	80
3.2.2.5	Die kinetische Modellierung der Hemmung zeigt einen dualen Mechanismus	81
3.3	Trunkationsexperimente und Membranbindungsstudien	85
3.3.1	Deletion der N-terminalen β -Faltblatt-Domäne führt zu einer enzymatisch aktiven verkürzten LOX	86

3.3.2	Die N-terminale Domäne ist nicht essentiell für die Membranbindung.....	89
3.3.3	Der Austausch von oberflächenexponierten, hydrophoben zu geladenen Aminosäuren führt zu einer verringerten Membranbindungsfähigkeit	91
3.3.4	LOX-Mutanten mit verringerter Membranbindungsfähigkeit sind weniger in der Lage, luminale Proteine aus Mikrosomen freizusetzen.....	98
4	DISKUSSION	100
4.1	Enzymreinigung.....	100
4.2	LOX-Substrat-Wechselwirkung und Reaktionsmechanismus	101
4.2.1	Substratbindung bei 12/15-Lipoxygenasen	101
4.2.2	Substratbindung bei der 5-Lipoxygenase	102
4.2.3	Möglicher Einfluss einer positiv geladenen Aminosäure in der Substratbindungstasche auf die Substratorientierung	104
4.2.4	Zusammenfassung der Erkenntnisse über die Substratbindung bei Lipoxygenasen	106
4.3	Hemmung durch Ebselen und pharmakologische Relevanz.....	107
4.3.1	Hemmmechanismen von Ebselen für die Lipoxygenase im Grundzustand und für die katalytisch aktive Form	107
4.3.2	Bedeutung der Ergebnisse für einen Einsatz von Ebselen als LOX-Inhibitor <i>in vivo</i>	108
4.4	Trunkationsexperimente und Membranbindung der LOX.....	109
4.4.1	Trunkation der Lipoxygenase.....	109
4.4.2	Bedeutung der N-terminalen Domäne für die Membranbindung.....	109
4.4.3	Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Membranbindung	110
4.4.4	Zusammenfassung der Erkenntnisse zur Membranbindung der 15-LOX und Vergleich mit Ergebnissen zu anderen Lipoxygenasen.....	110
5	LITERATURVERZEICHNIS	112

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

12S-H(P)ETE	(12S,5Z,8Z,10E,14Z)-12-Hydro(pero)xyeicosa-5,8,10,14-tetraensäure
13S-H(P)ODE	(13S,9Z,11E)-13-Hydro(pero)xyoctadeca-9,11-diensäure
15S-H(P)ETE	(15S,5Z,8Z,11Z,13E)-15-Hydro(pero)xyeicosa-5,8,11,13-tetraensäure
5S-H(P)ETE	(5S,6E,8Z,11Z,14Z)-5-Hydro(pero)xyeicosa-6,8,11,14-tetraensäure
8S-H(P)ETE	(8S,5Z,9E,11Z,14Z)-8-Hydro(pero)xyeicosa-5,9,11,14-tetraensäure
Amp	Ampicillin
ASR	Arachidonsäurerest (Teil der Arachidonsäure von der Carboxylgruppe bis C-18)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CP-HPLC	Chiralphasen-HPLC
DiH(P)ETE	Dihydro(pero)xyeicosatetraensäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat-Set
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKRM	EDTA High Salt stripped Rough Microsomes
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EXAFS	Erweiterte Röntgenabsorptionsfeinstruktur (Extended X-Ray Absorption Fine Structure)
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
hnRNP	heterogenes Kernribonucleoprotein (heterogenous nuclear ribonucleoprotein)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatographie)
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilo Basenpaare
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotrien

LX	Lipoxin
LXA4	5S,6R,15S-Trihydroxy-7,9,13-trans-11-cis-eicosatetraensäure
LXB4	5S,14R,15S-Trihydroxy-6,10,12-trans-8-cis-eicosatetraensäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger Ribonucleic Acid)
Ni-Agarose	Nickelagarose
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHGPx	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC (Reverse Phase HPLC)
SMP	Submitochondriale Partikel
SP-HPLC	Normalphasen-HPLC (Straight Phase HPLC)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAE	Tris/Acetat/EDTA
UpM	Umdrehungen pro Minute

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Glu	E	Glutamat
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

1 Einleitung

1.1 Vorkommen und Nomenklatur von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOXn) sind nichthämeisenhaltige Dioxygenasen. Sie katalysieren den stereospezifischen Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren unter Bildung von Hydroperoxyverbindungen. Sie sind sowohl im Tier- (Brash, 1999; Kuhn und Thiele, 1999) als auch im Pflanzenreich (Grechkin, 1998; Mack et al., 1987; Oliw, 2002) weit verbreitet und kommen auch in Pilzen (Bisakowski et al., 1997; Oliw, 2002; Su und Oliw, 1998), sowie in niederen Meeresorganismen (Brash et al., 1996; Brash et al., 1991; Hada et al., 1997; Hawkins und Brash, 1987) vor. Kürzlich wurden LOX-Gene sogar in zwei Bakterienstämmen gefunden wobei die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers diskutiert wurde (Porta und Rocha-Sosa, 2001).

Alle LOXn sind relativ eng miteinander verwandt. So unterscheiden sich die pflanzliche Sojabohnen LOX-1 und die 15-LOX aus unreifen roten Blutzellen (Retikulozyten) des Kaninchens zwar durch ihre Größe (95 kDa vs 75 kDa), die Raumstruktur ist jedoch sehr ähnlich. Auf der Aminosäureebene besteht zwischen diesen beiden Enzymen noch eine Sequenzhomologie von 31%, die jedoch im Bereich des aktiven Zentrums deutlich höher ist. Im Folgenden wird vor allem näher auf die LOXn aus Säugetieren eingegangen, die Gegenstand dieser Arbeit sind.

Allgemein werden LOXn nach ihrer Positionsspezifität klassifiziert, d.h. nach dem Kohlenstoffatom des Substrats Arachidonsäure ([5Z,8Z,11Z,14Z]-Eicosa-5,8,11,14-tetraensäure), an dem der Einbau des molekularen Sauerstoffs erfolgt (Smith und Weidemann, 1980; Webb, 1992; Yamamoto, 1992). Dementsprechend unterscheidet man bei Säugetieren 5-, 8-, 12- und 15-LOXn, die die folgenden primären Produkte bilden:

- (5S,6E,8Z,11Z,14Z)-5-Hydroperoxyeicosa-6,8,11,14-tetraensäure (5S-HPETE)
- (8S,5Z,9E,11Z,14Z)-8-Hydroperoxyeicosa-5,9,11,14-tetraensäure (8S-HPETE)
- (12S,5Z,8Z,10E,14Z)-12-Hydroperoxyeicosa-5,8,10,14-tetraensäure (12S-HPETE)
- (12R,5Z,8Z,10E,14Z)-12-Hydroperoxyeicosa-5,8,10,14-tetraensäure (12R-HPETE)
- (15S,5Z,8Z,11Z,13E)-15-Hydroperoxyeicosa-5,8,11,13-tetraensäure (15S-HPETE).

Die gebildeten Hydroperoxide werden in zellulären Systemen schnell zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen (HETEs) reduziert. In tierischen Zellen spielen dabei Glutathionperoxidasen (Funk, 1993; Schnurr et al., 1996) eine große Rolle. Die Lipoxygenasereaktion wird in Abschnitt 1.3 besprochen.

Die erste LOX wurde bereits 1932 beschrieben (Andre und Hou, 1932). Sie stammt aus Sojabohnen und wurde damals noch als Lipoxidase bezeichnet. 1947 gelang die Isolierung und Kristallisation des Enzyms (Theorell et al., 1947), die ersten Röntgenstrukturdaten der Sojabohnen-LOX-1 wurden jedoch erst 1993 erhalten (Boyington et al., 1993). Auch in tierischen Geweben wurden seit langer Zeit Lipidperoxidationen beobachtet, die jedoch zunächst als Häminkatalyse gedeutet wurden (Boyd und Adams, 1955; Tappel, 1953). Erst in den 70er Jahren wurden die ersten LOXn in tierischen Zellen beschrieben: in Thrombozyten (Hamberg und Samuelsson, 1974; Nugteren, 1975), Retikulozyten (Schewe et al., 1975) und polymorphkernigen Leukozyten (Borgeat et al., 1976). Seitdem steigt die Zahl der identifizierten LOXn ständig an. So wurden sie u. a. in menschlichen eosinophilen Granulozyten (Sigal et al., 1988; Turk et al., 1982), Bronchialepithelzellen (Hunter et al., 1985; Sigal und Nadel, 1988) und in der Uteruszervix (Flatman et al., 1986) beschrieben.

Durch die Fertigstellung des humanen Genomprojektes sind heute alle Gene für menschliche LOX-Isoformen bekannt. Es konnten sechs funktionelle LOX-Gene identifiziert werden, die mit Ausnahme des 5-LOX-Gens auf Chromosom 17 lokalisiert sind (Funk et al., 2002). In Tab. 1 sind die funktionellen humanen LOX-Gene zusammengefasst und die entsprechende LOX-Isoform sowie deren Verbreitung in Zellen bzw. Gewebearten angegeben.

Tab. 1: Humane LOX-Gene und Verbreitung der entsprechenden LOX-Isoform (s. u.)

Gen-Bezeichnung	LOX-Isoform	Hauptsächliches Vorkommen (Literatur)
ALOX15	15-LOX-1	Retikulozyten (Sigal et al., 1988), eosinophile Granulozyten (Turk et al., 1982), Bronchialepithelzellen (Hunter et al., 1985) Übersichtsartikel (Nadel et al., 1991)
ALOX15b	15-LOX-2	Haarwurzeln, Haut, Prostata, Cornea, Bronchialepithelzellen (Brash et al., 1997)
ALOX12	Plättchen-Typ 12-LOX	Thrombozyten (Nugteren, 1975), Epidermis (Hussain et al., 1994; Takahashi et al., 1993)
ALOX12b	12R-LOX	Haut (Boeglin et al., 1998), Tonsillen (Schneider et al., 2001)
ALOXE3	Epidermis-Typ LOX-3	Haut (Krieg et al., 2001)
ALOX5	5-LOX	Leukozyten (Goldyne et al., 1984; Rouzer et al., 1986; Rouzer und Samuelsson, 1985), Dendritische Zellen (Spanbroek et al., 1998)

Darüber hinaus existieren mindestens drei Pseudogene. Vermutlich führten Genduplikationen, von denen man weiß, dass sie gehäuft auf Chromosom 17 vorkommen, zu der Vielzahl der LOX-Gene (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). In Tab. 2 sind die Lokalisation und die Strukturen der humanen LOX-Gene dargestellt (Funk et al., 2002). Für fast alle Gene ist die Exon-Intron-Struktur identisch, obwohl sie sich in der Größe unterscheiden.

Tab. 2: Übersicht des Aufbaus der menschlichen LOX-Gene (Funk et al., 2002)

Chromosomal localization, size and introns of human *lipoxygenase* functional and pseudogenes

Gene	Size (kb)	Chromosome location	Intron A (bp)	Intron B (bp)	Intron C/C1 (bp)	Intron D (bp)	Intron E (bp)	Intron F (bp)	Intron G (bp)	Intron H (bp)	Intron I (bp)	Intron J (bp)	Intron K (bp)	Intron L (bp)	Intron M (bp)
<i>ALOX5</i>	81.7	10q11.2	8053	≈22000	16254	11727	812	3485	11665	710	1607	199	190 bp	287	1221
<i>ALOX12</i>	14.3, 19.2 ^a	17p13.1	573	1481	124	115	249	869	1122	3446	514	458	3139, 7734 bp ^b	108	117
<i>ALOX12B</i>	≈15	17p13.1	1075	4829 ^b	129	319	293	229	>2079	246	312	458	<3 kb	342 ^b	197 ^b
<i>ALOX15</i>	10.7	17p13.2	1885	297	78	165	203	958	1146	2259	98	163	579 bp	124	109
<i>ALOXE3</i>	21.2	17p13.1	863	1087	549,328	2288	561	830	89	89	572	584	4243 bp	622	6873
<i>ALOX12P2</i>	6.6	17p13.1	401	193	90	89	143	812	94	1440	238	101	461 bp	102	107
<i>ALOX12P1</i>	>12	17q11.2–17p11.2							630	3440	240	140	6240 bp	130	180
<i>ALOX15P</i>	>4.2	17p13.1		297	78	479	199	1010	1135						

The data in this table are a compilation from the public databases between February and September 2001 and the February 16, 2001 Celera human genome sequence [20]. There are still errors and gaps in both renditions and it is likely that some of the data in this table will change with updated versions of the human sequence. *ALOX15B* gene has not been cloned and is not present in either the public or Celera February 16, 2001 release

^a The *ALOX12* gene had variable size in intron K in three different clones so the size of this gene may range from 14.3 to about 19.2 kb.

^b Some of the introns still have gaps; the intron sizes are from the Celera database. In addition to the genes mentioned above a 206 bp *ALOX15* homologous fragment was found at 17p11.2 and another fragment on chromosome 9. These may represent partial duplications.

In der Maus wurden sieben funktionelle LOX-Gene gefunden, die sehr ähnlich zu den menschlichen organisiert sind. Sie befinden sich zum Großteil auf Chromosom 11. Zusätzlich zu den humanen Orthologen besitzen Mäuse noch eine Epidermis-Typ 12-LOX (Aloxe). Das entsprechende Gen existiert auch beim Menschen (*ALOX12P2*), allerdings nur als Pseudogen.

Drei der sieben Maus-LOXn konnten bereits gezielt ausgeschaltet werden (Chen et al., 1994; Johnson et al., 1998; Sun und Funk, 1996). Die entsprechenden Maus-Stämme zeigten unter Normalbedingungen keine phenotypischen Veränderungen. Auffälligkeiten konnten jedoch unter Stressbedingungen beobachtet werden, was zur Aufklärung der biologischen Rolle der LOXn beitrug.

Die oben beschriebene Einteilung der LOXn entsprechend der Oxygenierungsstelle der Arachidonsäure hat sich durch verschiedene Aspekte als unzureichend herausgestellt. Hierauf wird im Folgenden näher eingegangen:

- Der Vergleich von Sequenz und Enzymeigenschaften der beiden 15-LOXn aus Kaninchen-Retikulozyten und menschlichen eosinophilen Granulozyten legte nahe,

dass es sich bei diesen LOXn um orthologe Enzyme in unterschiedlichen Spezies handelt. Die Suche nach weiteren 15-LOXn dieser Art in anderen Spezies ist bisher erfolglos geblieben. Es gibt jedoch eine Reihe von Hinweisen, dass es sich bei den Leukozyten-Typ-12-LOXn der Maus (Chen et al., 1994), des Schweins (Yoshimoto et al., 1991), der Ratte (Watanabe et al., 1993) und des Rinds (De Marzo et al., 1992) um das Funktionsäquivalent der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX handelt. So ist z. B. die Sequenzhomologie zwischen diesen Enzymen wesentlich höher als die zu anderen 12-LOXn (Plättchen-Typ, Epidermis-Typ) (Kuhn und Thiele, 1999). Weiterhin haben sie ähnliche Enzymeigenschaften wie Substratspezifität und Reaktionskinetik. Die menschliche Retikulozyten-Typ-15-LOX und die Maus-Leukozyten-Typ-12-LOX zeigen einen ähnlichen Mechanismus der Regulation der Genexpression durch Zytokine (Conrad et al., 1992; Heydeck et al., 1998; Nassar et al., 1994).

- Eine zweite menschliche 15-LOX wurde 1997 in Haarwurzeln gefunden, die u. a. auch in der Haut, der Prostata und der Lunge exprimiert wird (Brash et al., 1997). Diese Epidermis-Typ-15-LOX oder 15-LOX-2 besitzt nur geringe Homologie zu der 15-LOX-1 und fundamental andere Enzymeigenschaften. So wird Arachidonsäure ausschließlich zu 15-HPETE oxygeniert (Typ 1-15-LOX hat eine duale Positionsspezifität, 12/15 (Bryant et al., 1982; Funk et al., 1990; Kuhn et al., 1990)) und Linolsäure wird weniger effektiv umgesetzt (für Typ 1-15-LOX ist Linolsäure ein besseres Substrat als Arachidonsäure).
- In der Maus gibt es vier verschiedene 12-LOXn mit grundlegend unterschiedlichen Eigenschaften und zum Teil nur geringer Sequenzhomologie.

Aus diesen Punkten ergibt sich, dass LOX-Isoformen mit gleicher Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung nicht zwangsläufig ähnlich in ihren sonstigen Eigenschaften sein müssen. Andererseits scheinen LOXn unterschiedlicher Positionsspezifität durchaus sehr nahe miteinander verwandt sein zu können. Aus diesen Gründen wurde eine weitere Unterteilung der LOXn hinsichtlich des Vorkommens in bestimmten Zelltypen eingeführt, die zum einen der Sequenzhomologie entspricht, zum anderen auch den enzymatischen Eigenschaften und damit der biologischen Relevanz Rechnung trägt (Furstenberger et al., 2002; Kuhn und Thiele, 1999): in Retikulozyten-Typ oder auch 12/15-Lipoxygenasen (enthalten die LOXn aus Retikulozyten und Leukozyten), Plättchen-Typ (bisher nur 12-LOXn) und Epidermis-Typ (8-, 12- und 15-LOXn). Die 5-LOXn bilden eine eigene Gruppe (Abb. 1).

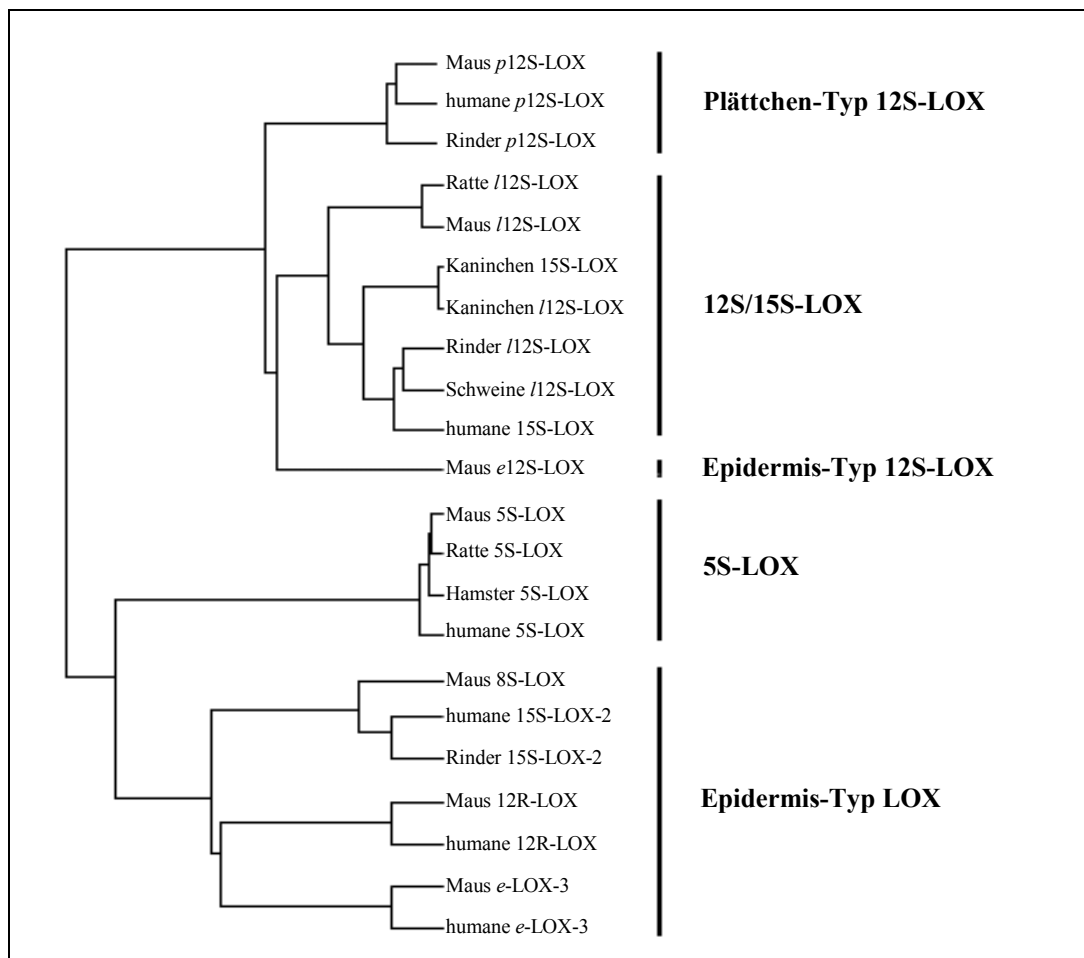


Abb. 1: Phylogenetischer Baum: Klassifizierung der LOXn aus Säugetieren nach (Furstenberger et al., 2002)

1.2 Biologische Bedeutung der Lipoxxygenasen

Trotz der steigenden Zahl an charakterisierten LOXn ist die Frage ihrer physiologischen Signifikanz noch zu weiten Teilen unklar. Im Folgenden wird eine Übersicht der bisher gefundenen physiologischen und pathophysiologischen Bedeutungen der tierischen LOXn, vor allem der 12/15-LOXn, aufgeführt.

1.2.1 Entzündungsreaktion und Asthma

Am besten aufgeklärt ist die Funktion der 5-LOX bei der Synthese von bioregulatorischen Verbindungen auf dem Lipoxxygenase-Weg der Arachidonsäurekaskade. Dieses Enzym nimmt eine Schlüsselrolle in der Biosynthese der Leukotriene (LT) ein, die als Mediatoren bei inflammatorischen und anaphylaktischen Prozessen beteiligt sind (Lewis et al., 1990;

Samuelsson et al., 1987). Damit ist die 5-LOX auch pharmakologisch von großem Interesse. Allerdings ist ihre proinflammatorische Rolle nur ein Aspekt, da das Enzym auch in Zellen exprimiert wird, die an entsprechenden Prozessen nicht beteiligt sind, so zum Beispiel in reifenden Keratinozyten (Janssen-Timmen et al., 1995). In ruhenden alveolaren Makrophagen ist die 5-LOX im Nukleus lokalisiert, weswegen eine Beteiligung an der Regulation der Genexpression diskutiert wird (Brock et al., 1994; Woods et al., 1995).

15-LOX Produkte besitzen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkung: 15-HPETE bewirkt eine Entzündungsreaktion in der Haut von Kaninchen (Higgs et al., 1981), 13-HODE und 5-Oxo-15-HETE induzieren Chemotaxis (Henricks et al., 1991; Schwenk et al., 1992). Auf der anderen Seite hemmt 15-HETE die Leukotrien B₄ Synthese und dessen Chemotaxis (Fischer et al., 1992; Herlin et al., 1990; Vanderhoek et al., 1980). Ein *in vivo* Nachweis der entzündungshemmenden Aktivität der 15-LOX erfolgte in Ratten. Nieren, in die das 15-LOX Gen transfiziert wurde, sind geschützt gegen experimentelle Glomerulonephritis (Munger et al., 1999).

Ein großer Teil der antiinflammatorischen Eigenschaften der 15-LOX geht möglicherweise auf deren Beteiligung an der Bildung von Lipoxinen (LX) zurück (Übersichtsartikel: (Fierro und Serhan, 2001; Serhan, 2002)). Diese Trihydroxytetraen-Verbindungen (z. B. LXA₄: 5S,6R,15S-Trihydroxy-7,9,13-trans-11-cis-eicosatetraensäure, LXB₄: 5S,14R,15S-Trihydroxy-6,10,12-trans-8-cis-eicosatetraensäure) werden offensichtlich über einen transzellulären Mechanismus (Edenius et al., 1990; Edenius et al., 1991; Serhan und Sheppard, 1990) unter Beteiligung verschiedener LOX-Isoformen gebildet. Zum einen setzt die 5-LOX das 15-LOX Produkt 15-H(P)ETE zu Lipoxinen um, womit eine Hemmung der eigentlichen 5-LOX-Reaktion einhergeht (Serhan, 1994). Zum anderen kann das über die 5-LOX gebildete LTA₄, die Vorstufe des pro-inflammatorischen LTB₄, durch die 15-LOX (auch durch 12-LOX_n) in Lipoxine umgewandelt werden. Darüber hinaus hemmen Lipoxine die Chemotaxis von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (Lee et al., 1989) und deren Interaktion mit Endothelzellen (Papayianni et al., 1996), während sie die Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten stimulieren (Maddox et al., 1997). Insgesamt sind Lipoxine also lokale, endogene Botenstoffe, die eine Hemmung der Entzündungsreaktion und Stimulation der Wundheilung bewirken können (Fierro und Serhan, 2001).

Eine Reihe von Hinweisen deutet auf eine Beteiligung der 15-LOX an bronchialen

Asthma hin. So ist z. B. die 15-LOX Expression und die Zahl der 15-LOX exprimierenden Zellen in Patienten mit Asthma signifikant erhöht (Profita et al., 2000).

1.2.2 Zellreifung und Differenzierung

Viele Hinweise deuten auf eine Beteiligung der Retikulozyten-Typ 15-LOX an Zellreifungs- und Differenzierungsprozessen hin. Bereits 1975 vermuteten Schewe et al. eine entscheidende Rolle während der Erythropoese, was zunächst vor allem durch zwei experimentelle Ergebnisse gestützt wurde (Schewe et al., 1975):

1. Diese LOX besitzt die Fähigkeit, komplexe Substrate wie veresterte Fettsäuren und biologische Membranen zu oxygenieren (Murray und Brash, 1988; Schewe et al., 1975; Takahashi et al., 1993). Entsprechende Produkte wurden in der Mitochondrienmembran und zu einem geringeren Teil auch in der Plasmamembran nachgewiesen (Kuhn et al., 1990).
2. Die 15-LOX wird in den Retikulozyten des Kaninchens (Rapoport et al., 1979), der Ratte (Kroschwald et al., 1986; Schewe et al., 1990) und des Menschen (Kroschwald et al., 1989) exprimiert. Diese Expression ist zeitlich limitiert und fällt mit dem Abbau der Mitochondrien zusammen (Rapoport und Schewe, 1986). Darüber hinaus ist die ubiquitinabhängige Proteolyse der Mitochondrien in dieser Phase der Retikulozytenreifung durch 15-LOX Inhibitoren hemmbar, was für eine direkte Beteiligung der 15-LOX an diesem Vorgang spricht (Dubiel et al., 1981; Grullich et al., 2001).

Es muss allerdings betont werden, dass die 12/15-LOX nicht essentiell ist für den Mitochondrienabbau in Retikulozyten. So zeigen 12/15-LOX knock-out Mäuse unter Normalbedingungen keine signifikanten Störungen in der Erythropoese (Sun und Funk, 1996).

Ebenfalls könnten LOXn beim Abbau der Organellen während der Reifung von Fibrillen in der Augenlinse eine Rolle spielen. Dies wurde aus dem Vorhandensein von LOX-Signalen in immunohistochemischen Untersuchungen der Maus-Augenlinse geschlossen (van Leyen et al., 1998). Miller et al. berichteten von einer Beteiligung der 12/15-LOX an der Interaktion von Makrophagen mit apoptotischen Zellen und an deren Phagozytose (Miller et al., 2001). Es muss allerdings betont werden, dass in vielen Phagozyten keine Expression der 12/15-LOX nachgewiesen werden konnte, weshalb das Enzym kaum als für den Prozess der Phagozytose essentiell angesehen werden kann.

1.2.3 Atherosklerose

Ein Schlüsselereignis in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques ist die Bildung von lipidbeladenen Schaumzellen. Diese entstehen aus Makrophagen oder glatten Muskelzellen durch die unkontrollierte Aufnahme von modifiziertem LDL über Scavenger-Rezeptoren, welche, im Gegensatz zur LDL-Aufnahme über den LDL-Rezeptor, nicht rückkopplungshemmbar ist (Henriksen et al., 1981). Die Ablagerung dieser Schaumzellen im subendothelialen Raum der Arterien ist der erste Schritt bei der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen.

Bereits 1985 wurde 15-HETE in der atherosklerotischen Gefäßwand nachgewiesen (Henriksson et al., 1985). Der erste direkte Hinweis auf eine Beteiligung der 15-LOX an der Entstehung atherosklerotischer Läsionen *in vivo* stammt von Ylä-Herttuala *et al.* aus dem Jahr 1990. Sie fanden 15-LOX-1 mRNA und Protein zusammen mit oxidiertem LDL in Makrophagen-reichen Regionen von atherosklerotischen Läsionen, während die normalen Gefäßwände keine LOX enthielten (Ylä-Herttuala et al., 1990). Lipidextrakte von atherosklerotischen Läsionen aus Kaninchen enthielten spezifische 15-LOX-Produkte, die zeitlich mit der Lipidablagerung in der Aortenwand zusammentrafen (Kuhn et al., 1994). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für entsprechende menschliche Läsionen. Während Folcik *et al.* in allen Läsionen über einen spezifischen Anteil an 15-LOX-Produkten berichteten (Folcik et al., 1995), wurde dieser von Kühn *et al.* nur in den frühen Läsionen gefunden (Kuhn et al., 1997). Obwohl der Anteil der spezifischen 15-LOX Produkte relativ klein war, deutet deren Nachweis auf eine *in vivo* abgelaufene LOX-Reaktion hin, ohne sie jedoch zu beweisen.

Die in Endothelzellen, aktivierten menschlichen Monozyten und Maus-Makrophagen exprimierte LOX oxidiert LDL und diese Reaktion kann *in vitro* durch LOX-Inhibitoren gehemmt werden (McNally et al., 1990; Parthasarathy et al., 1989; Rankin et al., 1991). Genauer untersucht wurde die Reaktion der 15-LOX mit LDL im isolierten Zustand (Belkner et al., 1998) und im menschlichen Plasma (Yamashita et al., 1999). Neben der direkten Oxygenierung von LDL-Lipidestern kann die LOX auch die zuvor aus den Lipidestern enzymatisch freigesetzten Fettsäuren oxygenieren (Neuzil et al., 1998).

Weitere Hinweise auf eine proatherosklerotische Wirkung der LOX ergeben sich aus folgenden Studien: Makrophagen, bei denen das Gen für die 12/15-LOX zerstört ist, sind weniger in der Lage, LDL zu oxygenieren (Sun und Funk, 1996), während 15-LOX überexprimierende Fibroblasten und Monozyten dies verstärkt tun (Benz et al., 1995).

Allerdings gilt dies nicht für alle Transfektanten, was darauf hinweist, dass die Expression der 12/15-LOX allein für ein erhöhtes zelluläres Potential zur LDL-Oxidation nicht ausreicht. Die Überexpression der 15-LOX im vaskulären Endothel führte bei transgenen Mäusen, denen der LDL-Rezeptor fehlt, zu einer Beschleunigung der Entstehung von Atherosklerose (Harats et al., 2000). Die funktionelle Zerstörung der Maus-Makrophagen-12-LOX in Apolipoprotein-E- oder LDL-Rezeptor-knock-out Mäusen führte zu einer signifikanten Verringerung der atherosklerotischen Ablagerungen (Cyrus et al., 1999; George et al., 2001). Des Weiteren hemmen 15-LOX-Inhibitoren die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen in Kaninchen, die mit einer cholesterolreichen Nahrung gefüttert wurden (Bocan et al., 1998; Sendobry et al., 1997).

Im Gegensatz zu den o. g. Ergebnissen gibt es aber auch einige Untersuchungen, die eine anti-atherosklerotische Wirkung der LOX nahe legen. So sind transgene Kaninchen, die die menschliche Retikulozyten-Typ-15-LOX makrophagenspezifisch überexprimieren, gegen Atherosklerose geschützt. Bei ihnen ist die Menge der Lipidablagerungen in der Aorta signifikant geringer als bei Kontrolltieren (Shen et al., 1996). Auch die durch eine experimentelle Anämie induzierte Expression der 12/15-LOX in Kaninchen und Mäusen führte zu einer verringerten Entwicklung von atherosklerotischen Plaques (Paul et al., 1999; Trebus et al., 2002).

Grundsätzlich ist die Rolle der 12/15-LOX in der Atherosklerose noch nicht ausreichend geklärt und es bedarf weiterer Studien. Vorstellbar sind z. B. Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus Tiermodellen (Maus, Kaninchen) und den Gegebenheiten beim Menschen. Möglicherweise ist die Expression der 12/15-LOX in atherosklerotischen Läsionen auch ein Schutzmechanismus (Simon et al., 1990). Demnach könnte die Wirkung der LOX zunächst, d.h. im frühen Stadium der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques, eine antiatherogene Funktion haben, die im späteren Verlauf aber in eine proatherogene Wirkung umschlagen kann (Kuhn und Chan, 1997).

Kürzlich wurde auch über eine mögliche Beteiligung der 5-LOX an der Atherosklerose bei Mäusen berichtet (Mehrabian et al., 2002). Mäuse, bei denen die Expression der 5-LOX nur etwa 1/5 des normalen Levels beträgt (CON6-Mäuse), sind trotz LDL-Rezeptor knock outs gegen Atherosklerose geschützt. Die Züchtung heterozygoter 5-LOX-knock-out Mäuse, die auch LDL-Rezeptor defizient waren (5-LOX^{+/-}/LDL-Rezeptor^{-/-}), bestätigten diesen Zusammenhang. In diesen Tieren entsprach die 5-LOX-Expression etwa dem Level der CON6-Mäuse, auch sie zeigten drastisch verringerte atherosklerotische Läsionen

gegenüber LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen (5-LOX^{+/+}/LDL-Rezeptor^{-/-}).

1.2.4 Karzinogenese

Die Beteiligung von Lipoxygenasen an der Entstehung bzw. Metastasierung von Karzinomen ist zurzeit ein weit verbreitetes Thema in der Forschung, wobei zum Teil widersprüchliche Ergebnisse existieren. Während Gupta *et al.* über eine verstärkte Expression und Aktivität der 5-LOX in menschlichen Prostata-Tumoren berichteten (Gupta et al., 2001), fanden Shappell *et al.* keinerlei 5-LOX-Aktivität in dem Tumorgewebe, d.h. sie konnten kein 5-HETE nachweisen (Shappell et al., 1999). 5-LOX Inhibitoren (z. B. MK886) leiteten Apoptose in Prostatakrebszellen ein (Anderson et al., 1998; Ghosh und Myers, 1998). Ob dies auf die Hemmung der 5-LOX zurückzuführen ist, bleibt allerdings noch unklar, da die benötigte Hemmstoff-Konzentration den IC50-Wert um ein Vielfaches übersteigt (Dixon et al., 1990). Darüber hinaus leitete MK886 auch in Zellen, die keine 5-LOX exprimieren, Apoptose ein (Datta et al., 1999).

Viele Ergebnisse zeigen eine pro-karzinogene Wirkung der Plättchen-Typ-12-LOX (Übersichtsartikel: (Honn et al., 1994)). Diese wird u. a. exprimiert im Prostatakarzinom (Gao et al., 1995), Pankreaskarzinom (Ding et al., 1999), Mammakarzinom (Connolly und Rose, 1998; Natarajan et al., 1997; Natarajan und Nadler, 1998) und Bronchialkarzinom (Chen et al., 1994). 12(S)-HETE bewirkt eine Reihe von Effekten, die die Metastasierung von Tumoren beeinflussen, darunter die Verstärkung der Mobilität (Liu et al., 1994; Timar et al., 1993) und des Adhäsionsvermögens von Tumorzellen an das Epithel und die Ausbreitung in der Subepithel-Matrix (Honn et al., 1989), sowie die Sekretion von lysosomalen Proteinasen (Ulbricht et al., 1996). Die Bedeutung von 12-HETE für die Tumor-Metastasierung wurde auch *in vivo* nachgewiesen (Chen et al., 1994; Connolly und Rose, 1998; Liu et al., 1994; Nie et al., 1998). Bisher ließ sich jedoch aus den Daten noch kein Therapiekonzept ableiten.

Auch die 15-LOXn werden mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht, allerdings ist ihre Rolle weniger klar als die der 12-LOX. Während Ikawa *et al.* eine erhöhte Expression der 15-LOX-1 in Dickdarmkrebszellen beobachteten (Ikawa et al., 1999), berichteten Shureiqi *et al.* eine signifikant geringere Expression und geringere Konzentration von 13-HODE in Tumorzellen im Vergleich zu normalem Gewebe (Shureiqi et al., 1999). Sie folgerten daraus eine Herunterregulation der 15-LOX-1 Expression in Dickdarmtumorgewebe und eine anti-Tumor-Wirkung von 13(S)-HODE durch Hemmung der Zellteilung

und Einleitung der Apoptose.

Eine Beteiligung der 15-LOXn in Prostatakarzinomen wird ebenfalls diskutiert. Spindler *et al.* fanden 13(S)-HODE im Tumorgewebe, jedoch nicht im benachbarten gesunden Gewebe (Spindler *et al.*, 1997). Kelavkar *et al.* zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression der 15-LOX-1 und einer mutierten Form des Tumor-Suppressor-Gens p53 (Kelavkar und Badr, 1999). Darüber hinaus fanden sie eine Korrelation zwischen der Expression und der Malignität des Tumors (nach ‚Gleason staging‘), was eine Rolle der 15-LOX-1 in der Tumorentwicklung nahe legt (Kelavkar *et al.*, 2000). Überexpression von 15-LOX-1 in PC-3 Zellen bewirkte eine verstärkte Zellteilung, die durch einen 15-LOX-1-Inhibitor dosisabhängig gehemmt werden konnte (Kelavkar *et al.*, 2001). Während des Fortschreitens von Prostatakarzinomen werden die Expression der 15-LOX-2 und die Bildung von 15-HETE immer mehr reduziert (Shappell *et al.*, 1999), was indirekt zu einer verstärkten Zellteilung und reduzierten Differenzierung in Prostatakarzinomzellen führen kann (Shappell *et al.*, 2001). Auch Tang *et al.* wiesen den Verlust der 15-LOX-2 Expression in allen getesteten Prostatakarzinom-Zelllinien nach und schlussfolgerten eine hemmende Wirkung der 15-LOX-2 auf die Entwicklung von Prostatakarzinomen (Tang *et al.*, 2002). Demgegenüber ist allerdings die Rolle von 15-HETE, dem Produkt der 15-LOX-2 und auch der 15-LOX-1, noch umstritten. So gibt es Studien, aus denen geschlossen wurde, dass 15S-HETE die Apoptose unterdrückt (Herrmann *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1996) oder keinen Einfluss auf die Apoptose in Tumorzellen hat (Bortuzzo *et al.*, 1996; Desplat *et al.*, 1999), bzw. dass 15S-HPETE Apoptose in Lymphozyten einleitet (Sandstrom *et al.*, 1994).

Zusammenfassend muss man sagen, dass weitere Forschung nötig ist, um die Rollen der verschiedenen LOXn bei der Karzinogenese eindeutig zu bestimmen und Widersprüche aufzuklären.

1.2.5 Weitere Funktionen

Neben den bereits genannten Leukotrienen (u. a. Entzündungsreaktion) und 12-HETE [u. a. Beteiligung an der Proliferation verschiedener Zellen wie epidermale Keratinozyten (Chan *et al.*, 1985) und vaskulären Endothelzellen (Tang *et al.*, 1995) sowie Tumormetastase (s. o.)] spielen weitere LOX-Produkte eine Rolle als bioaktive Botenstoffe. So ist die

15-LOX an der Synthese von Lipoxinen (Serhan et al., 1984) und Hepoxilinen (Anton und Vila, 2000) beteiligt, und deren Produkte 15-HETE, 13-HODE und 12-HETE regulieren u. a. Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten (Buchanan et al., 1998). Verschiedene Studien deuten auf eine Beteiligung von LOXn an der Apoptose hin. Allerdings gibt es sowohl Ergebnisse, die für eine pro-apoptotische Rolle der LOX sprechen (Gu et al., 2001; Maccarrone et al., 2000; O'Donnell et al., 1995), als auch Versuche, bei denen Apoptose nach Hemmung von LOXn eingeleitet wurde (Avis et al., 2001; Ding et al., 1999; Tang et al., 1996; Tang und Honn, 1997). Zurzeit ist noch unklar, inwieweit ein direkter Zusammenhang zwischen LOXn und Apoptose besteht. Denkbar ist auch, dass die beobachteten Effekte auf unspezifische Hemmstoffe, sehr hohe (physiologisch irrelevante) Konzentrationen von Hemmstoffen, Arachidonsäure oder LOX-Produkten, oder nur auf eine Störung des zellulären Redox-Gleichgewichtes zurückzuführen sind.

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Effekt beruht auf dem Vermögen von 12/15-LOXn, in Membranen oder Lipoproteinen veresterte mehrfachungesättigte Fettsäuren zu oxygenieren. Da einige Phospholipasen (Chaitidis et al., 1998) und neutrale Cholesterolesterhydrolasen (Belkner et al., 2000) oxidierte Esterlipide als Substrat bevorzugen, kann die LOX so, unabhängig von der konventionellen Arachidonsäure-Kaskade, zu einer Erhöhung der zellulären Konzentration an freien Hydro(pero)xyfettsäuren beitragen. Kürzlich wurde auch gefunden, dass erhöhte Konzentrationen an unveresterter Arachidonsäure, möglicherweise auch deren oxygenierte Formen, in Zellen Apoptose auslösen können (Cao et al., 2000).

1.3 Die Lipoxygenasereaktion

Die Reaktion der LOX, die Synthese von Hydroperoxyfettsäuren aus molekularem Sauerstoff und mehrfach ungesättigter Fettsäure, verläuft über die Bildung radikalischer Intermediate. Ein aktives Enzym erfordert zunächst die Oxidation des Nichthämeisens zum Eisen[III] durch Peroxide. Hierzu sind auch die LOX-Produkte selbst, die Hydroperoxyfettsäuren in der Lage (Autokatalyse) (Yamamoto, 1989). Dies erklärt eine kurze kinetische lag-Phase zu Beginn der Reaktion, die durch Zusatz von Hydroperoxyfettsäuren zum Reaktionsansatz unterdrückt werden kann (de Groot et al., 1975; Rouzer und Samuelsson, 1986; Schilstra et al., 1992; Yokoyama et al., 1986).

Man kann bei der LOX-Reaktion vier Schritte unterscheiden (Abb. 2):

1. Wasserstoffabstraktion von einer doppelallylständigen Methylengruppe des Substrats:

Dies geschieht sowohl regio- als auch stereospezifisch. Bei Arachidonsäure gibt es drei doppelallylständige Methylengruppen, die Wasserstoffabstraktion erfolgt jedoch gezielt nur an einer, bzw. zu geringerem Anteil auch an einer zweiten Methylengruppe (LOXn mit dualer Positionsspezifität). Darüber hinaus wird immer das pro-S Wasserstoffatom (bzw. pro-R bei R-LOXn) abstrahiert. Diese Selektivität wird vor allem durch die Lage des Substrats in der Bindungstasche des Enzyms bestimmt (s. u.). Wie unter anderem aus dem Vergleich von kinetischen Konstanten mit Wasserstoffisotopen (Deuterium, Tritium) ermittelt wurde, erfolgt diese Wasserstoffabstraktion ausschließlich nach einem Tunnelmechanismus (Knapp und Klinman, 2002; Rickert und Klinman, 1999). Nach diesem quantenmechanischen Phänomen erfolgt der Transfer eines Wasserstoffatoms nicht wie beim klassischen Weg über sondern durch eine Energiebarriere hindurch. Somit können Prozesse ablaufen, die nach dem klassischen Ansatz energetisch verboten wären.

Nach homolytischer Spaltung der C-H Bindung entsteht ein mesomeriestabilisiertes Fettsäure-Radikal. Das Radikal-Elektron ist dabei entweder über alle fünf möglichen C-Atome delokalisiert (Pentadienylradikal (Schewe et al., 1986)) oder nur über einen Teil (Allylradikal (Nelson et al., 1994)), was weniger sterische Probleme verursachen würde. Die Wasserstoffabstraktion ist geschwindigkeitsbestimmend für die ganze Reaktion (Egmond et al., 1973; Rickert und Klinman, 1999), mit ihr einher geht die Reduktion des Nicht-Hämeisens zum Fe[II].

2. Umlagerung des Radikals:

Für das radikalische Elektron gibt es die Möglichkeiten einer Verschiebung in Richtung Methylende der Fettsäure ([+2], es wandert zwei C-Atome weiter) oder zum Carboxylende ([-2]-Verschiebung) (Kuhn et al., 1986). In beiden Fällen folgt die Ausbildung eines konjugierten Z-E-Dien-Systems. Prinzipiell erfolgt eine Verschiebung nur in eine Richtung, deren Kontrolle aber noch ungeklärt ist. Ausgehend von einem Allylradikal wird wieder die Konformation der Fettsäure im aktiven Zentrum als entscheidend angenommen.

3. Sauerstoff-Insertion:

Auch die Insertion des molekularen Sauerstoffs erfolgt stereospezifisch und zwar

von der der Wasserstoffabstraktion gegenüberliegenden Seite der von den Doppelbindungen gebildeten Ebene (antarafacialer Charakter) (3). Wie der Sauerstoff zum aktiven Zentrum gelangt, ist noch Gegenstand der Forschung. Diskutiert werden eine diffusionskontrollierte Bewegung durch die Substratbindungstasche bzw. ein separater Sauerstoffkanal von der Enzymoberfläche zum aktiven Zentrum (Knapp et al., 2001).

4. Reduktion des Peroxidradikals:

Unter Oxidation des Eisens zum Eisen[III] (Wiederherstellung des katalytisch aktiven Zustands) erfolgt die Übertragung eines Elektrons auf das radikalische Peroxy-Intermediat und damit die Reduktion zum Peroxid-Anion. Die letztendliche Kontrolle der Regio- und Stereospezifität der Reaktion unterliegt möglicherweise vor allem diesem letzten Schritt, da das Elektron wahrscheinlich nur in einer ganz bestimmten sterischen Anordnung übertragen werden kann.

Das Produkt, die Hydroperoxyfettsäure, entsteht durch Reaktion des Peroxid-Anions mit einem Proton (4).

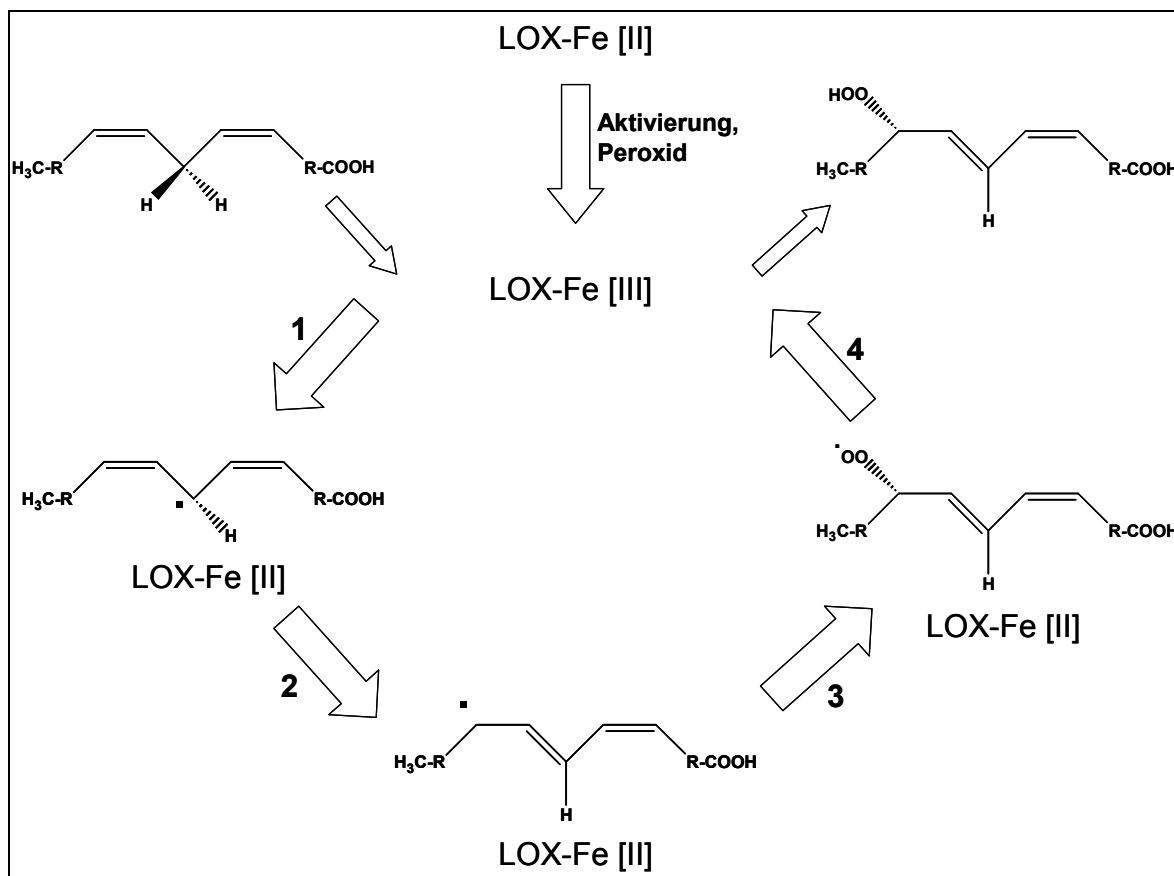


Abb. 2: Schematische Darstellung der Lipoxygenasereaktion

1. Wasserstoffabstraktion, 2. Umlagerung des Radikals, 3. Sauerstoffinsertion, 4. Reduktion des Peroxidradikals unter Wiederherstellung des aktivierten Enzymzustands (LOX-Fe[III])

Die kürzliche Kristallisation der Sojabohnen-LOX-3 mit einer Hydroperoxyfettsäure im aktiven Zentrum zeigte einen Fettsäureperoxid-Eisen-Komplex, der die Reduktion des Fettsäureperoxidradikals mit gleichzeitiger Regeneration des Eisen[III] gut erklären könnte (Skrzypczak-Jankun et al., 2001).

Eine weitere Eigenschaft der tierischen LOXn ist ihre Multifunktionalität. Die primären Produkte aus der Arachidonsäureoxygenierung können aufgrund weiterer doppelallylständiger Methylengruppen erneut oxygeniert werden (Bryant et al., 1985; Maas et al., 1982; Ueda und Yamamoto, 1988; Yokoyama et al., 1986). Hierbei entstehen Dihydroperoxyverbindungen (Di-HPETE) oder bei dreifacher Oxygenierung die biologisch relevanten Lipoxine (Kuhn et al., 1987). Tierische Lipoxxygenasen sind darüber hinaus zur Synthese von Epoxy-Verbindungen in der Lage. Die 5-LOX katalysiert die Dehydratisierung von 5-HPETE zu Leukotrien A₄ (LTA₄) (Rouzer et al., 1986; Shimizu et al., 1984). Sie spielt damit eine duale Rolle in der Leukotrienbiosynthese. Bei der Dehydratisierung von 15-HPETE durch 12/15-LOXn entsteht das 14,15-LTA₄ (Bryant et al., 1985; Maas et al., 1982; Yokoyama et al., 1986).

Unter anaeroben oder hypoxischen Bedingungen zeigen LOXn auch Hydroperoxidaseaktivität (Verhagen et al., 1978). Dabei entstehen durch homolytische Spaltung der O-O-Bindung zunächst Alkoxy- und Hydroxylradikale, die dann zu Aldehyden und Alkanen umgelagert werden oder dimerisieren können (Salzmann et al., 1984; Verhagen et al., 1978).

Die LOXn verschiedener Gruppen (s. o.) besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten. Während 5-LOXn und 12-LOXn vom Plättchentyp nur Arachidonsäure als Substrat akzeptieren, (Hada et al., 1991; Ochi et al., 1983; Takahashi et al., 1988; Yokoyama et al., 1986) metabolisieren die 12/15-LOXn alle mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C₁₈ und C₂₂ darunter Linolsäure (Hauptprodukt: (13S,9Z,11E)-13-Hydroperoxy-octadeca-9,11-diensäure, 13-HPODE) und α - und γ -Linolensäure (Bryant et al., 1982; Claeys et al., 1985; Yamamoto, 1991; Yokoyama et al., 1986). Darüber hinaus sind die 12/15-LOXn aber auch die 15-LOX-2 in der Lage, Phospholipide zu verstoffwechseln, selbst wenn diese in Biomembranen oder Lipoproteinen enthalten sind (Belkner et al., 1993; Kozak et al., 2002; Murray und Brash, 1988; Schewe et al., 1975; Takahashi et al., 1993). Hierzu ist eine Bindung der LOX an entsprechende Strukturen notwendig.

Brinckmann *et al.* zeigten, dass die 15-LOX *in vitro* und *in vivo* an die Membranen von Zellorganellen bindet. Diese Bindung ist kalziumabhängig und geht mit einer Steigerung der LOX-Aktivität einher (Brinckmann *et al.*, 1998). Weiterführende Studien mit Sedimentations-Versuchen zeigten eine 15-LOX-Bindung an die Membranen von Mitochondrien, Peroxysomen, Golgi und Endoplasmatischem Retikulum (ER). Dabei wurden bei längerer Inkubation luminal Proteine freigesetzt, während integrale Membranproteine im Pellet des Sedimentations-Versuchs verblieben (van Leyen *et al.*, 1998). Daraus wurde auf eine Permeabilisierung der Organellmembran geschlossen. Diese Annahme konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen unterstützt werden, in denen porenartige Strukturen in Liposomen und der ER-Membran nach einer Inkubation mit LOX zu sehen waren, deren Größe für die Freisetzung luminaler Proteine ausreichte. Des Weiteren fanden van Leyen *et al.*, dass die Bindung des Enzyms an Membranen unabhängig von Membranproteinen erfolgt.

1.4 Regulation der zellulären Lipoxygenaseaktivität

Ein Enzym, das u. a. an dem Abbau von Zellorganellen beteiligt ist, muss einer starken Kontrolle unterliegen. Für die 15-LOX wurden Regulationselemente auf transkriptioneller und translationaler sowie der posttranslationalen Ebene beschrieben.

Ein Element der transkriptionellen Regulation sind Interleukine (IL). So wurde für verschiedene Zellen wie periphere Monozyten (Conrad *et al.*, 1992), A549- (Brinckmann *et al.*, 1996) und Caco-2-Zellen (Kamitani *et al.*, 2000) nach Behandlung mit IL-4 bzw. IL-13 eine verstärkte Expression der 15-LOX gefunden. Die Signaltransduktions-Kaskade erfordert einen funktionalen IL-4 Rezeptor (Brinckmann *et al.*, 1996), den Transkriptionsfaktor STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Conrad und Lu, 2000; Heydeck *et al.*, 1998) sowie verschiedene Phosphorylierungs- und Azetylierungsprozesse (Kamitani *et al.*, 2001; Shankaranarayanan *et al.*, 2001).

Während einer experimentellen Anämie beim Kaninchen wird die Expression der 15-LOX in vielen Zellen und Geweben stark hochreguliert (Berger *et al.*, 1998). Der auslösende Mechanismus ist noch unbekannt, es wird jedoch die Beteiligung von Zytokinen angenommen.

Im frühen Entwicklungsstadium von Kaninchen-Retikulozyten sind in diesen Zellen große Mengen 15-LOX-mRNA enthalten, jedoch kein Enzym nachweisbar (Thiele et al., 1982). Inzwischen wurde der Mechanismus dieser Translationshemmung weitgehend aufgeklärt. Verantwortlich ist die Bindung zweier regulatorischer Proteine, hnRNP K und hnRNP E₁ (Ostareck et al., 1997), an repetitive Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich der 15-LOX-mRNA (differentiation control elements, DICE) (Ostareck-Lederer et al., 1994), was offensichtlich eine Bindung der 60S-Ribosomen-Untereinheit verhindert (Ostareck et al., 2001).

Obwohl es bei der 15-LOX nicht zu posttranslationalen Veränderungen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung kommt, gibt es einige Elemente, die die spezifische Aktivität des Enzyms beeinflussen. So erfordert die Aktivierung des Enzyms eine Oxidation des Eisen[II] zum Eisen[III], was u. a. durch intrazelluläre Peroxide initiiert werden kann (de Groot et al., 1975). Daher spielt der Peroxidtonus in der Zelle eine wichtige regulative Rolle. Dementsprechend kann man Peroxid-reduzierende Enzyme wie vor allem die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) als posttranslationalen LOX-Regulator betrachten (Thomas et al., 1990). Dies gilt auch für die Oxygenierung von Biomembranen durch die 15-LOX. Es wurde gezeigt, dass die Oxidation durch Vorinkubation mit der PHGPx verhindert werden kann (Schnurr et al., 1996).

Ein weiteres regulatives Element ist die zytosolische Kalzium-Konzentration. Die 15-LOX bindet in Gegenwart von Kalzium an Membranen und diese Bindung geht mit einer bis zu 10fachen Steigerung der Enzymaktivität einher (Brinckmann et al., 1998). Beim Entfernen des Kalziums durch Komplektion mit EDTA dissoziiert das Enzym wieder von der Membran, was eine Reversibilität der Membranbindung anzeigt.

Ein wichtiger Regulationsmechanismus der LOX-Aktivität ist die irreversible Selbstinaktivierung. Sie erfolgt bereits nach wenigen Reaktionszyklen oder bei einer hohen Produktkonzentration (Gan et al., 1995; Hartel et al., 1982; Kishimoto et al., 1996; Rapoport et al., 1984; Rapoport et al., 1986). Der Mechanismus dieser Inaktivierung ist noch zu weiten Teilen unklar, es scheint jedoch die kovalente Bindung von radikalischen Reaktionsintermediaten an das Enzym eine Rolle zu spielen (Wiesner et al., 2003).

1.5 Struktur der Lipoxygenasen

1.5.1 Primärstruktur

Alle LOXn bestehen aus einer einzelnen Polypeptid-Kette. Die bisher identifizierten tierischen LOXn setzen sich aus 662 bis 711 Aminosäuren zusammen und sind damit ca. 200 Aminosäuren kürzer als die meisten pflanzlichen Enzyme. Zum Beispiel besitzen die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX und die Schweine 12-LOX vom Leukozyten-Typ 663 Aminosäuren (Fleming et al., 1989; Yoshimoto et al., 1990), die humane 15-LOX vom Retikulozyten-Typ 662 (Sigal et al., 1988) und die humane 5-LOX 674 Aminosäuren (Matsumoto et al., 1988), während die beiden 12R-LOXn vom Epidermis-Typ 711 Aminosäuren besitzen (Boeglin et al., 1998; Sun et al., 1998). Die Sequenzhomologie der tierischen LOXn variiert sehr stark und liegt zwischen 28 und 99% (Kuhn und Thiele, 1999), wobei wiederum die 12R-LOXn die größten Unterschiede zu den anderen LOXn aufweisen. Allerdings unterscheiden sich einzelne Bereiche der Primärstruktur hinsichtlich ihrer Homologie. So gibt es beispielsweise hochkonservierte Bereiche im Zentrum und am C-Terminus, während die N-terminalen Bereiche nur relativ geringe Sequenzhomologie aufweisen. Innerhalb der zentralen konservierten Region konnten bereits vor der Aufklärung von Kristallstrukturen mehrere Histidinreste als Eisenliganden durch ortsgerichtete Mutagenese bei verschiedenen LOXn identifiziert werden (Chen und Funk, 1993; Ishii et al., 1992; Nguyen et al., 1991; Zhang et al., 1992).

1.5.2 Kristallstruktur der Kaninchen-Retikulozyten 15-Lipoxygenase

Die erste komplette Kristallstruktur einer LOX konnte im Jahr 1993 für die Sojabohnen-LOX-1 aufgeklärt werden (Boyington et al., 1993), deren Auflösung später auf 1,4 Å verbessert wurde (Minor et al., 1996). In jüngerer Zeit folgte die Aufklärung der Strukturen der Sojabohnen-LOX-3 (Skrzypczak-Jankun et al., 1997) und von Sojabohnen-LOX-3-Liganden-Komplexen (Pham et al., 1998; Skrzypczak-Jankun et al., 2001).

Die erste Kristallisation einer tierischen LOX wurde bereits 1990 beschrieben (Sloane et al., 1990), die Struktur konnte jedoch erst 7 Jahre später aufgeklärt werden (Gillmor et al., 1997). Dabei handelt es sich um einen Enzym-Inhibitor-Komplex mit einer Auflösung von 2,4 Å. Obwohl die Kristallstrukturdaten nicht ganz komplett sind, geben sie einen guten Einblick in die strukturellen Gegebenheiten bei tierischen LOXn und zeigen eine deutliche strukturelle Verwandtschaft zu der Sojabohnen-LOX-1 (Abb. 3).

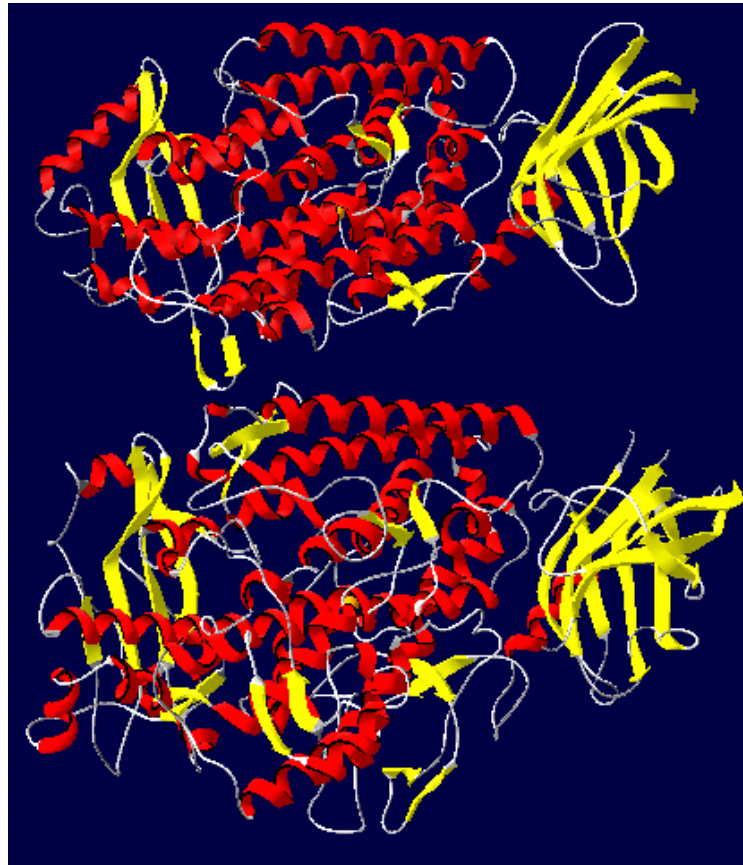


Abb. 3: Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX- (oben) und Sojabohnen-LOX-1-Struktur (unten) in der Backbone-Darstellung. Helix: rot, β -Faltblatt: gelb. Trotz des Größenunterschieds ist eine deutliche strukturelle Verwandtschaft zu erkennen.

Wie in Abb. 3 deutlich zu erkennen, besitzen LOXn zwei Domänen: Eine kleinere N-terminale β -Faltblatt-Domäne und eine größere C-terminale helikale Domäne. Bei der Kaninchen-Retikulozyten LOX besteht die N-terminale Domäne aus einem 8-strängigen β -Faltblatt und reicht von Aminosäure 1 bis etwa 115. Sie ist sehr ähnlich zu der C-terminalen β -Faltblatt-Domäne in tierischen Lipasen und könnte somit analog dieser eine Rolle bei der Anlagerung des Enzyms an Lipoproteine bzw. Biomembranen spielen (Gillmor et al., 1997). Diese Annahme wird unterstützt durch zwei oberflächenexponierte hydrophobe Aminosäuren in der 15-LOX, Phe70 und Leu71, die im Sequenzvergleich mit der humanen Lipoprotein Lipase mit zwei Tryptophanen übereinstimmen, die als Bindungsdeterminanten an Lipoproteine identifiziert wurden (Williams et al., 1994).

Die größere C-terminale Domäne ist über eine 1600 \AA^2 große Kontaktfläche mit der N-terminalen Domäne assoziiert. Sie besteht aus 18 Helices unterbrochen von einer β -Faltblatt-Subdomäne und drei weiteren kleinen β -Faltblatt-Strukturen in loops an der Proteinoberfläche. Sie enthält das katalytisch aktive Nichthämeisen.

Zwei der zentralen Helices nehmen über eine Länge von jeweils sieben Aminosäuren eine π -Helix-Konformation ein (Aminosäurereste 360 bis 366 und 537 bis 543), wodurch eine zur Eisenkomplexierung nötige Anordnung der in diesem Bereich liegenden vier Protein-Eisen-Liganden (His 361, His 366, His 541 und His 545) ermöglicht wird. Den fünften Eisenliganden bildet das in fast allen LOXn konservierte C-terminale Isoleucin (Ile 663 bei der Kaninchen-Retikulozyten LOX). Eine Veränderung des C-Terminus, z. B. durch Deletion oder Verknüpfung mit Proteinen wie GFP (Green Fluorescence Protein), sollte daher zu einem Verlust des Eisens und somit zu einer inaktiven Enzymspezies führen (Borngraber, 1996; Zhang et al., 1992). Die Kristallstruktur der Soja-LOX-1 zeigte ein Wassermolekül als sechsten Eisenliganden (Minor et al., 1996) trans zu His 691 (entspricht His 541 in der Kaninchen-Retikulozyten LOX), was aus Röntgenabsorptionsspektroskopie auch für die Kaninchen-Retikulozyten LOX geschlossen wurde (Kuban et al., 1998). Diese Position liegt an einem großen Hohlraum, der Substratbindungstasche, so dass das Wasser durch Substrate oder kompetitive Inhibitoren verdrängt werden könnte. Es ist auch möglich, dass dieser sechste Eisenligand ein OH^- ist und als starke Base für die Wasserstoff-Abstraktion Bedeutung hat (Minor et al., 1996). Die sechs Eisenliganden sind in der Kristallstruktur in einem annähernd regelmäßigen Oktaeder angeordnet (Abb. 4).

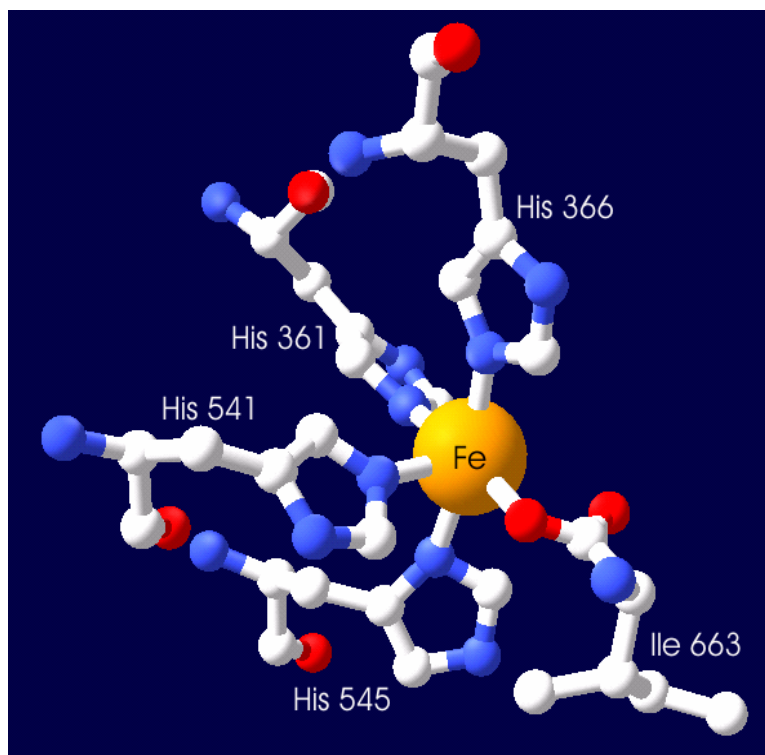


Abb. 4: Die Eisenligandensphäre der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX gebildet aus vier Histidinen und dem C-terminalen Isoleucin. Der sechste Ligand ist vermutlich ein Wasser (nicht dargestellt).

Bevor und auch nachdem die Kristallstrukturen der Soja-LOX und des Kaninchen Retikulozyten 15-LOX-Inhibitor-Komplexes bekannt waren, wurden diverse spektroskopische Methoden angewandt, um die Eisenumgebung näher zu charakterisieren (Dunham et al., 1990; Kuban et al., 1998; Pavlosky et al., 1995; Scarrow et al., 1994; Solomon et al., 1997). Insbesondere durch Röntgenabsorptionsspektroskopie und Interpretation der Feinstruktur der Spektren konnte die Eisenligandensphäre genauer beschrieben werden. Dabei wurden die Anzahl und der jeweilige Abstand der Eisenliganden bestimmt, wobei sich eine Verzerrung des Oktaeders in der Lösungsstruktur sowohl bei der Soja-LOX-1 als auch bei der Kaninchen Retikulozyten 15-LOX nachweisen ließ (Kuban et al., 1998; Scarrow et al., 1994). Auch hier wurden sechs Eisenliganden für die aktiven Enzymzustände ermittelt, deren Abstände zwischen 0,188 nm und etwa 0,3 nm liegen. Eine detaillierte Beschreibung der Röntgenabsorptionsspektroskopie, die auch Gegenstand dieser Arbeit ist, erfolgt in Abschnitt 2.6.5.1.

Wie bereits erwähnt, existiert in LOXn ein großer Hohlraum, an dessen einer Seite das katalytisch aktive Eisen lokalisiert ist. Dieser Hohlraum hat eine trichterförmige Öffnung an der Proteinoberfläche und macht etwa in Höhe des Eisens eine Krümmung, so dass eine stiefelähnliche Form entsteht. Die diese Tasche begrenzenden Aminosäuren sind bis auf zwei Ausnahmen hydrophob und hochkonserviert. Am Eingang der Tasche liegt eine positiv geladene Aminosäure, Arg 403, die mit der Carboxylgruppe der Substratfettsäure eine Wechselwirkung eingehen könnte. Die Mutagenese der äquivalenten Position in der humanen 15-LOX zu einem Leucin führte zu einer starken Verringerung von Substrataffinität und Reaktivität (Gan et al., 1996).

Die Existenz eines weiteren Kanals, der Sauerstoff den Zugang zum aktiven Zentrum ermöglichen soll, wird gegenwärtig noch diskutiert. Ein solcher Kanal könnte die Stereospezifität der LOX-Reaktion erklären, da der Sauerstoff kontrolliert nur von einer Seite herangeführt würde. In der ersten Kristallstruktur der Soja-LOX-1 wurde ein entsprechender 18 Å langer Kanal vorgeschlagen (Boyington et al., 1993), der jedoch in der Struktur mit verbesserter 1,4 Å Auflösung nicht bestätigt werden konnte (Minor et al., 1996). Jüngste experimentelle Ergebnisse mit der Soja-LOX-1 (Knapp et al., 2001) und mit modifizierten Substratfettsäuren und Enzymmutanten der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX (Ivanov *et al.*, unveröffentlichte Daten) deuten jedoch auf die Existenz eines Sauerstoffkanals sowohl bei der pflanzlichen Soja-LOX-1 als auch bei der Kaninchen-LOX hin.

1.5.3 Substratbindung und Determinanten der Positionsspezifität

Aufgrund des hydrophoben Charakters der Substratbindungstasche liegt es nahe, dass die Fettsäure mit dem hydrophoben Methylenende ins Innere der Substratbindungstasche eintaucht, während das hydrophile Carboxylende an der Enzymoberfläche bleibt. Diese Hypothese wurde durch verschiedene experimentelle Ergebnisse für die 12- und 15-LOXn bestätigt. So zeigten Versuche mit Arachidonsäure-Isomeren, in denen die Position der Doppelbindungen variiert wurde, dass der Abstand des doppelallylständigen Methylen vom Methylenende der Fettsäure entscheidend für die Reaktivität und Positionsspezifität ist (Kuhn et al., 1990). Durch ortsgerichtete Mutagenese der Aminosäuren Ile418 und Met419 der humanen 15-LOX gegen die entsprechenden Aminosäuren der humanen 12-LOX (Ala418, Val419) (Sloane et al., 1991) bzw. der Schweine 12-LOX (Val418, Val419) (Sloane et al., 1995) konnten 15-LOX-Enzymmutanten mit 12-LOX-Aktivität hergestellt werden. Entsprechende Untersuchungen an 12-LOXn führten zu 15-lipoxygenierenden Enzymspezies (Chen und Funk, 1993; Suzuki et al., 1994). Hieraus wurde gefolgert, dass die Größe und Geometrie der Seitenketten der Aminosäuren 418 und 419 die Position der Arachidonsäureoxygenierung durch 12- bzw. 15-LOXn entscheidend beeinflussen. Da es nicht gelang, die Ratten 12-LOX durch entsprechende Mutationen in eine 15-LOX umzuwandeln (Hada et al., 1994; Watanabe und Haeggstrom, 1993), wurden weitere Positions determinanten vermutet. Durch Konstruktion von Enzymchimären aus 15- und verschiedenen 12-LOXn sowie ortsgerichteter Mutagenese kritischer Aminosäuren in der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX konnten zwei weitere wichtige Aminosäuren für die Positionsspezifität der 15- bzw. 12-Lipoxygenierung ermittelt werden: Phe353 (Borngraber et al., 1996) und Ile593 (Borngraber et al., 1999). Eine Übersicht der Lage der identifizierten Positions determinanten der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX mit der hineinmodellierten Arachidonsäure zeigt Abb. 5. Die primären Positions determinanten sind in violett dargestellt, Aminosäuren mit geringerem Einfluss in grau.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die entsprechenden Aminosäuren den Boden der Substratbindungstasche bilden und damit durch ihre Größe die mögliche Tiefe des Eindringens des Substrats in die Tasche beeinflussen. Das an der Enzymoberfläche liegende Arg403, welches möglicherweise mit der Carboxylgruppe des Substrats wechselwirkt, besitzt eine sehr bewegliche Seitenkette und könnte somit ein unterschiedlich tiefes Eintauchen der Fettsäure tolerieren.

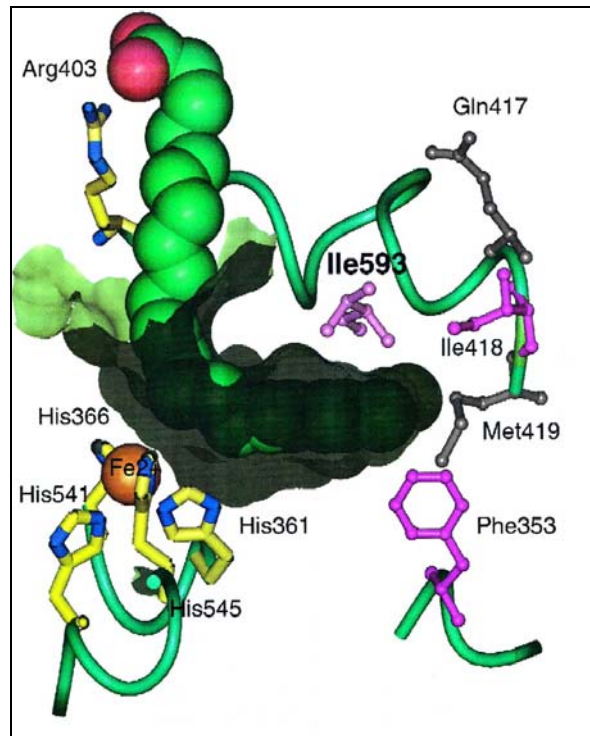


Abb. 5: Darstellung der Positions determinanten der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX (violett) mit dem katalytisch aktiven Eisen und der hineinmodellierten Arachidonsäure, aus (Borngraber et al., 1999).

Führt man mehrere Mutationen an den entsprechenden kritischen Aminosäuren durch, zeigt sich ein funktionelles Zusammenspiel, d.h. die Verkleinerung der Seitenkette an der einen Position kann durch entsprechende Vergrößerung an einer anderen ausgeglichen werden (Abb. 6). All diesen Positions determinanten gemein ist, dass der Austausch von großen Seitenketten der 15-LOX in kleinere die Spezifität von 15- zu 12-Lipoxygenierung verschob.

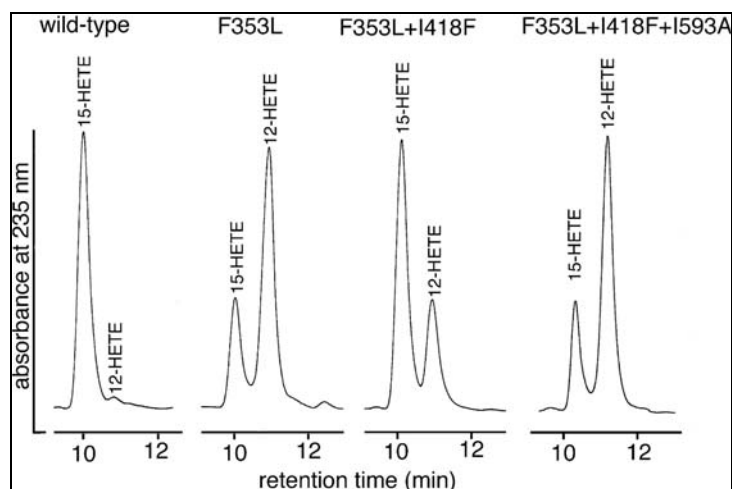


Abb. 6: Produktverhältnisse der verschiedenen Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX-Mutanten (HPLC-Chromatogramme) aus (Borngraber et al., 1999). Die jeweiligen Produkte verdeutlichen ein funktionelles Zusammenspiel der Positions determinanten.

Auch bei der Maus 8S-LOX und der humanen 15-LOX-2 (Epidermis-Typ), die trotz unterschiedlicher Positionsspezifitäten eine hohe Homologie aufweisen, konnten Positionsde-terminanten identifiziert werden. Die Mutation von Tyr603 und His604 des Maus-Enzyms in die entsprechenden Reste der humanen 15-LOX-2 führte zu einer Verschiebung von 8- zu vollständiger 15-Lipoxygenaseaktivität, die umgekehrte Strategie zu einer partiellen Änderung der Positionsspezifität der humanen 15-LOX-2 (Jisaka et al., 2000).

Die Umwandlung einer 15- in eine 12-LOX und umgekehrt ist also relativ leicht und kann bereits durch den Austausch einer Aminosäure erreicht werden. Frühere Versuche, eine 15-LOX in eine 5-LOX umzuwandeln, führten allerdings zu inaktiven Enzymspezies. Kürzlich ist es jedoch gelungen, durch den Austausch von vier Aminosäuren (F359W, A424I, N425M, A603I) die humane 5-LOX über eine 8-lipoxygenierende Spezies in eine 15-LOX umzuwandeln (Schwarz et al., 2001).

1.5.4 Hypothesen für die Ursachen der Positionsspezifität von Lipoxygenasen

Es existieren zurzeit zwei verschiedene Hypothesen, um die Positionsspezifität der 15- bzw. 12-LOXn und der 5-LOX auf Basis der Substratbindung zu erklären (Funk und Loll, 1997).

Volumen-Hypothese:

Die Ergebnisse der Mutageneseversuche, in denen eine 15-LOX durch Verkleinerung von voluminösen Aminosäuren in eine 12-LOX umgewandelt werden konnte, sowie die Versuche mit artifiziellen Fettsäuren und nicht zuletzt die Kristallstrukturen der Soja-bohnen- und der Kaninchen-Retikulozyten LOX sind Ausgangspunkt der Volumen-Hypothese. Nach dieser Hypothese wird die Größe der Substratbindungstasche für die unterschiedliche Positionsspezifität verantwortlich gemacht (Browner et al., 1998; Gillmor et al., 1997) (Abb. 8a). Das Substrat wird bei allen Isoformen mit dem Methyl-ende in der Bindungstasche gebunden. Demzufolge besitzen 15-LOXn eine sehr kleine Bindungstasche, das Substrat kann nicht besonders tief eindringen, so dass C-13 der Arachidonsäure an das katalytisch aktive Eisen kommt. Bei 12-LOXn ist der Hohlraum ein wenig größer, das Substrat kann tiefer in die Bindungstasche gelangen und C-10 ist am Eisen lokalisiert. Bei LOXn mit dualer Positionsspezifität befinden sich zwei dop-pelallylständige Methylene in Reichweite des aktiven Zentrums, so dass Wasserstoff-abstraktion von zwei unterschiedlichen C-Atomen erfolgen kann (z. B. C-13 und C-10

bei 12/15-LOXn). Die Tiefe dieser Substratbindungstasche liegt demzufolge zwischen denen der 15- und 12-LOXn.

Auch für die 5-LOXn wird eine solche konservierte Substratorientierung postuliert. Die Bindungstasche wird als noch voluminöser angenommen, wodurch C-7 der Arachidonsäure an das Eisen gelangt. Computermodele des aktiven Zentrums der 5-LOX ausgehend von der Kaninchen 15-LOX-Struktur ergaben eine 20% größere Bindungstasche, was für eine entsprechende Substratorientierung ausreichen würde (Browner et al., 1998). Zusätzlich wird möglicherweise das Substrat am Eingang der Bindungstasche durch Wechselwirkung der negativ geladenen Carboxylgruppe mit einer positiv geladenen Aminosäure (z. B. Arg 403 bei der Kaninchen-Retikulozyten LOX) fixiert (Gan et al., 1996; Gillmor et al., 1997).

Während diese Theorie für 12- und 15-LOXn weitgehend akzeptiert ist, vermag sie nicht ohne weiteres die beobachtete Stereospezifität bei 5-LOXn zu erklären (Prigge et al., 1996; Prigge et al., 1998). Obwohl 5-LOXn den Sauerstoff in der S-Konfiguration einfügen, erfolgen Wasserstoffabstraktion und auch die Sauerstoffinsertion im Vergleich zu 12S- und 15S-LOXn von der gegenüberliegenden Seite. Demzufolge zeigt die Hydroperoxygruppe des 5S-HPETE in die entgegengesetzte Richtung zu der von 12S- oder 15S-HPETE. Die gleiche Benennung des Isomers (S) ergibt aus der unterschiedlichen Lage der benachbarten Doppelbindung an dem jeweiligen chiralen Zentrum (Prioritätenregeln nach Cahn-Ingold-Prelog) (Abb. 7). Führt man sich die hohe Flexibilität der Arachidonsäure vor Augen, scheint es jedoch möglich, sowohl das pro-S-Wasserstoffatom des C-7 bei 5-LOXn als auch das pro-S-Wasserstoffatom von C-10 bzw. C-13 bei 12- und 15-LOXn am aktiven Zentrum zu positionieren (Browner et al., 1998).

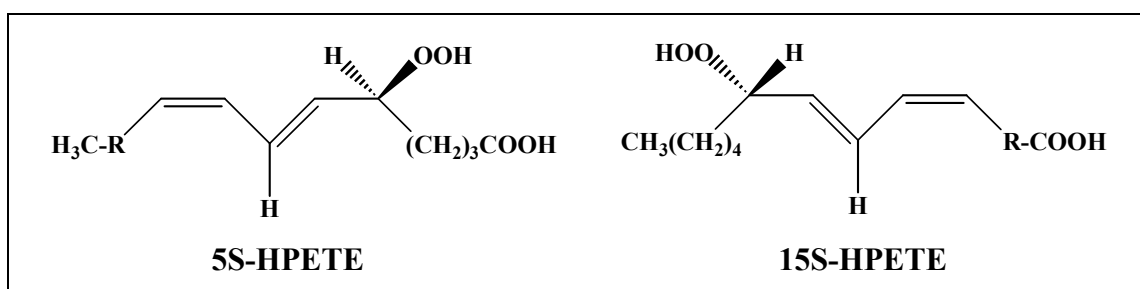


Abb. 7: Strukturen von 5S- und 15S-HPETE. Obwohl beide Produkte jeweils in der S-Konfiguration vorliegen, zeigen die Hydroperoxygruppen in entgegengesetzte Richtungen.

Auch die Radikalverschiebung bei der 5-LOX-Reaktion unterscheidet sich von der der anderen LOX-Isoformen. Während bei 12- und 15-LOXn eine [+2] Verschiebung auf-

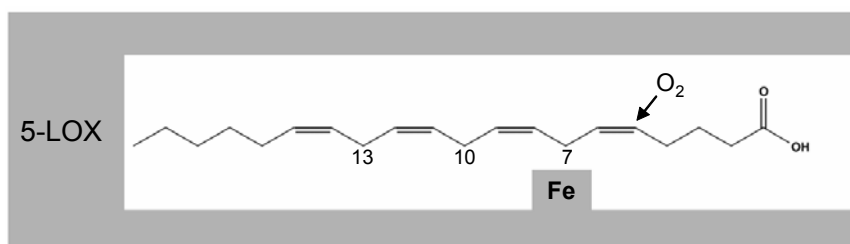
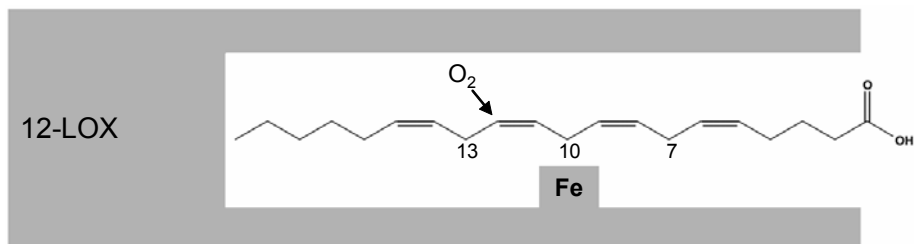
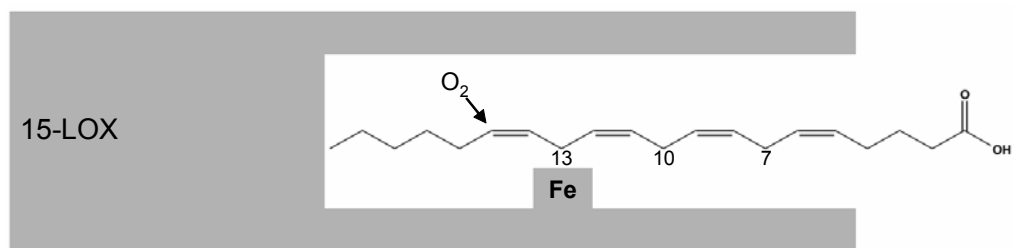
tritt, findet man bei der 5-LOX eine [-2] Verschiebung, d.h. das Radikal wandert in Richtung Carboxylende der Fettsäure.

Orientierungs-Hypothese:

Auch die Orientierungs-Hypothese geht für 12- und 15-LOXn von einer Bindung der Fettsäure mit dem Methylende in der Substratbindungstasche aus. Im Gegensatz dazu binden 5-LOXn nach dieser Hypothese das Substrat in inverser Orientierung, d.h. das Carboxylende der Fettsäure gelangt in die Bindungstasche (Prigge et al., 1998) (Abb. 8b). Diese Orientierung könnte sehr gut die Stereochemie der 5-LOX-Reaktion erklären, da, unter der Voraussetzung, dass das aktive Zentrum analog zu den 12- und 15-LOXn aufgebaut ist, Wasserstoffabstraktion und Oxygenierung von der Seite der Fettsäure stattfinden, die den beobachteten Produkten entspricht. Das Scheitern der Versuche, eine 15-LOX durch Mutagenese in eine 5-LOX umzuwandeln, unterstützten diese Theorie. Das Einführen der geladenen Carboxylgruppe in die hydrophobe Bindungstasche sollte jedoch zu energetischen Problemen führen (Browner et al., 1998).

Es ist davon auszugehen, dass sich die beiden Theorien nicht zwangsläufig gegenseitig ausschließen. So wurde beispielsweise für die Umsetzung von 15S-HPETE mit der Soja-LOX-1 eine 5S-Lipoxygenierung nachgewiesen (Produkt 5S,15S-DiHPETE) (Van Os et al., 1981). Wird die Carboxylgruppe von 15-HETE methyliert, ist 5-Lipoxygenierung sogar die Hauptreaktion mit der Soja-LOX-1 und der Kaninchen 15-LOX (Schwarz et al., 1998). Nach Mutation von Ile418 zu einem kleineren Ala wurde hauptsächlich 8S-Lipoxygenierung beobachtet (Produkt 8S,15S-DiHPETE). Diese Ergebnisse unterstützen eine inverse Orientierung des 15-HETE-Methylesters bei der 5-Lipoxygenierung durch 15-LOXn. Bei den 5-LOXn mag die Substratorientierung aber wiederum anders sein. So gibt es kinetische und experimentelle Hinweise, dass die 5-Lipoxygenierung, katalysiert durch 15- bzw. 5-LOXn, nach unterschiedlichen Mechanismen abläuft. Substrate mit veresterter Carboxylgruppe, die von der 15-LOX verstärkt an der Position C-5 oxygeniert wurden, werden von der 5-LOX nicht umgesetzt. Des Weiteren konnte die 5-LOX durch Austausch kleiner Aminosäuren gegen die bei der 15-LOX als Positions determinanten identifizierten voluminöseren Reste in eine 15-LOX umgewandelt werden (Schwarz et al., 2001). Die hier zu Grunde liegende Verkleinerung der Bindungstasche würde die Volumen-Hypothese unterstützen.

a) Volumenhypothese



b) Orientierungshypothese

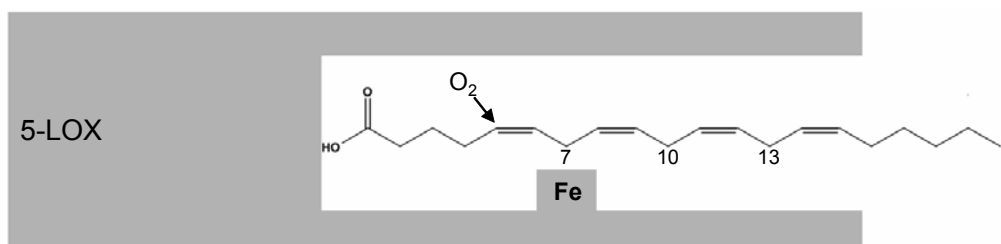


Abb. 8: Modelle der Substratbindung bei verschiedenen LOXn nach a) der Volumen-Hypothese und b) der Substrat-Orientierungs-Hypothese. Nach Wasserstoffabstraktion vom am Eisen lokalisierten doppelallylständigen C-Atom und Verschiebung des Radikals erfolgt Sauerstoffinsertion an den Pfeilen. Nach der Orientierungs-Hypothese wird das Substrat bei 5-LOXn invers, d.h. mit der Carboxylgruppe in der Bindungstasche, gebunden.

1.6 Lipxygenase-Hemmstoffe

Aufgrund der Beteiligung von tierischen LOXn an zahlreichen pharmakologisch relevanten Prozessen wie Entzündungsreaktion, Karzinogenese und Atherosklerose sind LOX-Inhibitoren von großem Interesse. Zurzeit laufen auch diverse Studien zu 5-LOX/Cyclooxygenase-Dual-Inhibitoren (Übersichtsartikel (Celotti und Laufer, 2001; Fiorucci et al., 2001)). In einem Maus-Modell wurde gezeigt, dass die antiinflammatorische Wirkung der kombinierten COX und LOX Inhibitoren deutlich höher ist als die der beiden Hemmstoffe allein (Nickerson-Nutter und Medvedeff, 1996). Darüber hinaus scheint ihre Verträglichkeit wesentlich besser zu sein als die anderer nichtsteroidaler entzündungshemmender Medikamente (NSAIDs) (Celotti und Laufer, 2001).

Neben dem therapeutischen Einsatz von LOX-Inhibitoren spielen diese auch eine wissenschaftliche Rolle. So kann der Einsatz LOX-Isoform-spezifischer Inhibitoren in *in vivo* Versuchen zur weiteren Aufklärung der Funktion von LOXn beitragen, indem Veränderungen nach gezieltem Ausschalten einer spezifischen LOX beobachtet werden.

Eine gezielte Entwicklung potentieller Inhibitoren (rational drug design) wurde jedoch lange Zeit durch fehlende Kristallstrukturen behindert, was sich erst durch die 1997 veröffentlichte Struktur des Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX-Inhibitor-Komplexes änderte. Nichtsdestotrotz existiert inzwischen eine Vielzahl von mehr oder weniger spezifischen LOX-Inhibitoren, darunter das Ebselen, auf das hier näher eingegangen werden soll.

1.6.1 Eigenschaften von Ebselen

Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on) (Abb. 9) ist eine selenoorganische Verbindung. Es besitzt nur geringe Toxizität und entwickelt ein breites Spektrum an pharmakologisch interessanten Wirkungen (Übersichtsartikel (Schewe, 1995)).

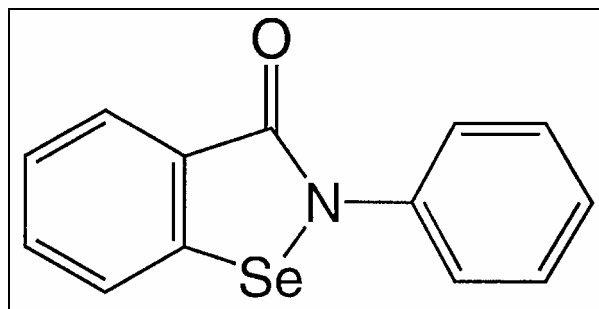


Abb. 9: Struktur von Ebselen

Ursprünglich wurde Ebselen als antiinflammatorischer Wirkstoff entwickelt (Cotgreave et al., 1989; Cotgreave et al., 1988; Gao und Issekutz, 1993). Es ist in der Lage, viele am Entzündungsprozess beteiligte Enzyme zu hemmen, darunter die NADPH-Oxidase (Cotgreave et al., 1989), die NO-Synthase (Hattori et al., 1994) und die 5-LOX (Schewe et al., 1994). Darüber hinaus hemmt es die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX (Schewe et al., 1994) und besitzt unter anderem antiatherosklerotische (Thomas und Jackson, 1991; Thomas et al., 1993) und zellschützende Eigenschaften (Li et al., 1994; Lin und Girotti, 1994).

Ebselen reduziert effektiv Hydroperoxide, darunter auch die in Biomembranen und Lipoproteinen. In Gegenwart von SH-Reagenzien wie Glutathion ist Ebselen in der Lage, eine katalytische Wirkung analog der PHGPx zu entwickeln (Sies, 1994). Viele der beobachteten Effekte werden auf diese Eigenschaft zurückgeführt, der Hemmmechanismus der meisten Enzyme wurde jedoch bisher nicht näher untersucht.

Für die Hemmung der LOXn wurde eine duale Wirkung des Ebselens vorgeschlagen (Schewe et al., 1994). Zum einen wird der Hydroperoxidtonus der Zellen durch die Glutathion-Peroxidase-Aktivität des Ebselens gesenkt und LOXn benötigen Hydroperoxide zur Aktivierung. Zum anderen erfolgt eine direkte Hemmung durch die Bildung eines LOX-Ebselen-Komplexes. Die genaue Untersuchung der Hemmung der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX durch Ebselen ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.7 Ziele der Arbeit

Die Positionsspezifität von LOXn ist keine unveränderbare Enzymeigenschaft, sondern hängt vielmehr von der spezifischen Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat ab. Die Ausrichtung des Substrats im aktiven Zentrum spielt dabei eine entscheidende Rolle und wird sowohl von der Größe kritischer Aminosäureseitenketten, den Positionsdeterminanten, als auch von der Struktur des Substrats beeinflusst. Demzufolge können Änderungen am Enzym ebenso wie Substratmodifizierungen zu einer veränderten Positionsspezifität führen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Arachidonsäurederivate mit LOXn unterschiedlicher Positionsspezifität umgesetzt und die Produktzusammensetzung sowie die Reaktionsraten bestimmt werden. Die hierdurch gewonnenen detaillierten Kenntnisse der Enzym-Substratwechselwirkung sollten zur Aufklärung der Orientierung

der Substrate im aktiven Zentrum der jeweiligen LOX-Spezies beitragen.

Ebenfalls zu den Untersuchungen am aktiven Zentrum gehörten Versuche mit einem LOX-Inhibitor, dem Ebselen. Diese Substanz gehört zu den stärksten LOX-Inhibitoren und ist zurzeit Gegenstand diverser klinischer Studien. Ziel dieser Arbeiten war es, den Mechanismus der Hemmung der LOX durch Ebselen eingehend zu untersuchen und mögliche Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit von Ebselen als LOX-Inhibitor *in vivo* zu treffen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Aufklärung des Mechanismus der Membranbindung der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX. Die Beteiligung am Abbau von Zellorganellen, der wichtigsten bisher bekannten Funktion dieser LOX, setzt die Fähigkeit voraus, an Biomembranen zu binden. In der Literatur wurde bereits die mögliche Funktion der N-terminalen β -Faltblatt-Domäne, insbesondere der Aminosäuren Phe70 und Leu71, für die Membranbindung vorgeschlagen. Diese Thesen sollten experimentell untersucht werden. Durch Expression einer nach Möglichkeit enzymatisch aktiven N-terminal trunkierten LOX-Spezies sollte die Beteiligung der gesamten N-terminalen Domäne an der Membranbindung überprüft werden. Außerdem war die Membranbindungsfähigkeit der LOX nach gezielter Mutagenese der beiden vorgeschlagenen Bindungsdeterminanten Phe70 und Leu71 in geladene Aminosäuren Gegenstand der Untersuchungen. Da es zweifelhaft erscheint, dass die N-terminale Domäne eine alleinige Rolle bei der Membranbindung spielt, sollten mögliche weitere Bindungsdeterminanten identifiziert und eine Enzymmutante exprimiert werden, die weitestgehend nicht mehr in der Lage ist, an Biomembranen zu binden. In *in vitro* Experimenten sollte dann die verbliebene Enzymaktivität dieser Mutante mit Biomembranen und Fettsäuren als Substrat untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Promega, Mannheim
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Antikörper: RGS-His (Maus)	Qiagen, Hilden
Antikörper: anti Kaninchen-IgG Peroxidasekonjugat	Sigma, Deisenhofen
Antikörper: anti Maus-IgG Peroxidasekonjugat	Sigma, Deisenhofen
Antikörper: PDI (Kaninchen)	Stressgen Biotechnol., Kanada
ATP	Roche, Mannheim
ATP-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Bis(Trimethylsilyl)trifluoracetamid	Sigma, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Serva, Heidelberg
dNTP-Lösung	Roth, Karlsruhe
Ebselen	Daiichi Pharmaceuticals Co.
U- ¹⁴ C-Ebselen (Spez. Radioaktivität 8 Ci/mol)	Dr. A. Wendel, Univ. Konstanz
5,8,11,14-Eicosatetrainsäure (ETYA)	Sigma, Deisenhofen
HPLC-Standards 5, 12, 15-HETE, 9, 13 HODE, jeweils R- und S-Isomer	Cayman Chem., Vertrieb: Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
Imidazol	Serva, Heidelberg
IPTG, Dioxanfrei	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Linolsäure	Serva, Heidelberg
Methoxyethanol	Serva, Heidelberg
Nickelagarose (Ni-Agarose)	Qiagen, Hilden
4-Nitrocatechol	Sigma, Deisenhofen
Nitrosomethylharnstoff	Sigma, Deisenhofen
Nordihydroguaiarsäure	Sigma, Deisenhofen
PD 146 176	Parke-Davis Pharm. Res., USA
Phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
Q-Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Sacharose	Sigma, Deisenhofen
Salicylhydroxamsäure	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Serva, Heidelberg
tert-Butylhydroxyanisol	Serva, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe

Wenn nicht anders angegeben, ist der Reinheitsgrad der Chemikalien p. a., der der Lösungsmittel HPLC-grade. Gebräuchliche Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) und sind nicht gesondert aufgeführt. HPLC-Laufmittel wurden bei Baker (Deventer, Niederlande) erworben.

Die verwendeten Substrat-Fettsäuren

cis-11,14-Eicosadiensäure
cis-5,8,11-Eicosatriensäure
cis-8,11,14-Eicosatriensäure
cis-11,14,17-Eicosatriensäure
cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure (Arachidonsäure)
cis-9,12-Octadecadiensäure (Linolsäure)
cis-6,9,12-Octadecatriensäure (γ -Linolensäure) und
cis-9,12,15-Octadecatriensäure (α -Linolensäure)

stammen von Sigma, Deisenhofen.

Ungewöhnliche Arachidonsäure-Derivate (siehe 3.2.1) wurden von I. Ivanov (Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moskau, Russland) synthetisiert (Ivanov et al., 2000).

In dieser Arbeit wurden zwei Modellbiomembranen verwendet:

Submitochondriale Partikel (SMPs) wurden von Dr. Kerstin Schnurr, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke, zur Verfügung gestellt und wurden aus Rinderherzen präpariert (Crane et al., 1956).

Eine Präparation von Endoplasmatischem Retikulum (EKRM, EDTA-high-salt-stripped rough microsomes) erfolgte aus Hunde Pankreas und wurde von Dr. Martin Wiedmann, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, USA

LB-Medium:

1% Bacto-Trypton
0,5% Hefe-Extrakt
0,5% NaCl
1 mM NaOH

LB-Agar:

LB-Medium + 1,5% Bacto-Agar

Die Antibiotikakonzentrationen in den Medien betrugen 100 mg/l Ampicillin (Amp) und für Bakterienklone, die das Prep4-Plasmid enthielten zusätzlich 25 mg/l Kanamycin (Kan).

PBS (phosphate buffered saline):

150 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
pH 7,4

TAE-Puffer (Tris/Acetat/Essigsäure-Puffer) :

40 mM Tris
20 mM Natriumacetat
29,6 mM Essigsäure
2 mM EDTA
pH 7,8

Weitere Puffer für spezielle Methoden werden in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

2.1.3 Enzyme und Kits

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
DNA Ligase, Bacteriophage T4	Roche, Mannheim
DNA Polymerase, <i>Pyrococcus woesei</i> (PWO)	Roche, Mannheim
DNA Polymerase <i>Thermus aquaticus</i> (Taq)	Promega, Mannheim
Miniprep Spin und Plasmid-Midi-Kit	Qiagen, Hilden
native Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX	Frau C. Gerth, AG Kühn
Qiaquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Western Lightning Chemilumineszenz plus	Perkin Elmer, Boston (USA)

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

pBluescript	Stratagene, La Jolla (USA)
pgem-T	Promega, Mannheim
pkk15LOX (15-LOX-cDNA in pkk233)	(Kuhn et al., 1993)
pkk5LOX (5-LOX-cDNA in pkk233)	(Schwarz, 2000)
pkk5LOX F359W,A424I,N425M,A603I	(Schwarz, 2000)
pQE-9	Qiagen, Hilden

Es wurden folgende Primer für die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX verwendet, deren Synthese von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, durchgeführt wurde:

Einführung der Sal I-Schnittstelle am N-Terminus:

Agg AAA CAg **gTC gAC** ggT gTC TAT CgC gTC

Trunkationsexperimente:

C-term.Domäne	gTC CAg AgC TTg CCA gTg ggC gTC gAC TgC ACC ACg
15-LOX-Gly155	TTA ATC CTg AAC gTC gAC ggg TCC AAg TTA
15-LOX-Glu165	ACT gAC CTC CCT gTC gAC gAg CgA TTT CTg
15-LOX-Phe175	gAg gAC AAg AAA gTC gAC TTC gAg gCT TCg
15-LOX-Pro197	TCg CTC AAT gTT gTC gAC CCC Tgg AAA ACT

Mutanten für Versuche zur Membranbindungsfähigkeit der 15-LOX:

Y15E	ggg gCC TCg ATC gAA gCg ggC TCC AAA
F70H	CgC AAA AAA CAC CAT CTC AAg gAA gAC gCC
L71K	CgC AAA AAA CAC TTT AAg AAg gAA gAC gCC
F,L70,71,HK	CTg CgC AAA AAA CAC CAT AAg AAg gAA gAC gCC Tgg
W181A	TCg CTg gCC gCg ggg CTg gCA gAg CTC
W181E	TCg CTg gCC gAg ggg CTg gCA gAg CTC
W181K	TCg CTg gCC AAg ggg CTg gCA gAg CTC
L195E	TCg CTC AAT gTT gAg gCT CCC Tgg AAA
Y292E	AAC gTC ATC CTG gAA TgC CAg CAg TAC
F412E	CTg gTC TCT gAc gAA ggC ATT TTT gAC

Primer für die humane 5-LOX:

Einführung der Sal I-Schnittstelle am N-Terminus:

Agg AAA CAg **gTC gAC** CCC TC TAC ACg gTC

Als zweiter Primer bei Mutagenesen diene jeweils die komplementäre Sequenz.

2.1.5 Bakterienstämme und Zelllinien

M15[prep4]	Qiagen, Hilden
Top10	Invitrogen, Karlsruhe
XL-1 Blue	Stratagene, La Jolla (USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten erfolgten nach Standardprotokollen aus der Literatur (Sambrook et al., 1989) bzw. entsprechend der Herstellerangaben. Hierzu zählen die Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen, die Ligation von DNA Fragmenten, die Präparation kompetenter Bakterien-Zellen, die Transformation von *E. coli*, sowie Arbeiten zur Gewinnung und Reinigung von DNA wie Plasmidpräparation im analytischen und präparativen Maßstab und Agarosegelelektrophoresen.

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Für die Umklonierung der rekombinanten Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX und der humanen 5-LOX, sowie für die Erzeugung von Punktmutationen (s. u.) kam die Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Einsatz.

Es wurde folgendes Standardprotokoll verwendet:

PCR-Ansatz:

- 25 ng Template DNA
- 5 µl Puffer (10x)
- 3 µl Mg SO₄ (25 mM)
- 5 µl 5'-Primer (5µM)
- 5 µl 3'-Primer (5µM)
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
- 0.5 µl Polymerase (5 U/µl)
- mit bidest auf 50 µl

Zeitprogramm:

1. 94°C 4 min
2. 94°C 40 s
3. 65°C 1 min
4. 72°C 2 min (Schleife an 2., 29 Zyklen)
5. 72°C 10 min

2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Erzeugung von Punktmutationen wurde die Überlappungs-Verlängerungs-Technik (overlap-extension) verwendet. Hierzu wurde zunächst für jeden der beiden DNA-Stränge eine PCR mit dem entsprechenden Mutagenese-Primer und einem stromauf- bzw. stromabwärtsliegenden Primer durchgeführt, so dass man zwei sich überlappende DNA-Fragmente jeweils mit der Punktmutation erhielt. In einer anschließenden dritten PCR wurden diese DNA-Fragmente als Template und die beiden außen liegenden Primer aus den PCRs 1 und 2 eingesetzt, so dass ein einzelnes DNA-Produkt mit der entsprechenden Punktmutation synthetisiert wurde. Nach Spaltung mit Restriktionsenzymen erfolgte dann abschließend die Ligation in den entsprechend gespaltenen Wildtyp-Expressionsvektor.

Einige der Mutanten zur Untersuchung der Membranbindungsfähigkeit sowie die Mehrfachmutanten wurden mit dem QuikChange Site-directed-Mutagenesis-Kit der Firma Stratagene unter Verwendung des Standardprotokolls erzeugt.

2.3 Expression der rekombinanten Lipxygenase

Um eine einfache und schnelle Reinigung der LOX zu ermöglichen, wurde das Enzym als (His)₆-tag Fusionsprotein exprimiert. Als Expressionsplasmid wurde pQE-9 gewählt, welches einen N-terminalen His-tag im richtigen Leserahmen gewährte.

2.3.1 Ligation der 15-LOX-cDNA in pQE-9

Um die 15-LOX in das pQE-9 Plasmid ligieren zu können, musste zunächst eine Sal I Schnittstelle unter Mutation des Start-Methionins eingeführt werden. Dazu wurde eine add-on PCR mit Taq-Polymerase durchgeführt, wobei der 3'-Primer hinter einer unikalenen Sfi I Schnittstelle innerhalb der kodierenden Region der cDNA liegend gewählt wurde. Das Produkt wurde über ein Agarose-Gel gereinigt und in den pgem-T Vektor ligiert, aus dem das gewünschte DNA-Fragment dann mit den Restriktionsenzymen Sal I und Sfi I herausgeschnitten wurde. Das zweite benötigte Fragment wurde aus der 15-LOX cDNA mit Sfi I und Hind III herausgeschnitten. Da die direkte Ligation der beiden Fragmente in das Expressionsplasmid pQE-9 nicht gelang, wurde zunächst in den mit Sal I und Hind III geschnittenen und dephosphorilierten pBluescript-Vektor ligiert. Nach Transformation in Top10-Zellen wurde aus dem präparierten Plasmid die komplette 15-LOX cDNA dann wieder mit Sal I und Hind III herausgeschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelten und dephosphorilierten pQE-9 Vektor ligiert. Dies führte zu einer Änderung des Enzym-N-Terminus (**Met-Arg-Gly-Ser-(His)₆-Gly-Ser-Val-Asp-LOX-(Gly-Val...)**).

2.3.2 Transformation des 15-LOX-pQE-9 Plasmids und Expression des Enzyms

Das 15-LOX-pQE-9 Plasmid wurde in M15[prep4]-Zellen transformiert, diese auf LB_{Amp/Kan}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Klone auf ihre 15-LOX-Aktivität überprüft (2.4.1.2). Der Klon mit der höchsten Enzymaktivität wurde zur Kontrolle durchsequenziert und für eine Vorkultur verwendet (15 ml LB_{Amp/Kan}), die bei 37°C und 200 UpM über Nacht inkubiert wurde. 4 ml der Vorkultur wurden verwendet, um jeweils 1 l Hauptkultur (LB_{Amp/Kan}) zu inokulieren. Diese Kultur wuchs bei 37°C und 200 UpM bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von ca. 1,0 (ungefähr 16 h), bevor die Enzymexpression durch Zusatz von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert wurde. Nach einer Inkubation bei 30°C für 2 h wurden die

Zellen abzentrifugiert (4000 g, 4°C, 15 min), mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert. Diese Vorgehensweise ergab sich aus einer Optimierung der Expressionsbedingungen. Es konnte keine 15-LOX-Aktivität gemessen werden, wenn nach Zugabe von IPTG eine Inkubation bei 37°C erfolgte. Ebenso führte eine längere Expression, sowie eine IPTG-Zugabe bei geringerer optischer Dichte zu einem Verlust von Enzymaktivität.

2.3.3 Reinigung der (His)₆-15-LOX über Nickel-Agarose

Die Zellen der Expressionskultur wurden in PBS resuspendiert (10 ml pro l Ausgangskultur) und entweder mit Ultraschall lysiert (5 mal 10 s 300 W Impulse, 0°C) oder mit einem Zellhomogenisator (Emulsiflex C5, Avestin) aufgeschlossen. Letzteres führte zu einer deutlich höheren Ausbeute an aktivem Enzym. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (14000 UpM im SS34 Rotor, 4°C, 30 min) und der Überstand mit Nickel-Agarose (200 µl pro l Ausgangskultur) bei 4°C für 30 min im Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Ni-Agarose wurde niedertourig abzentrifugiert (2 min 1000 UpM), in eine Leersäule überführt und zweimal mit dem fünffachen Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Das Enzym wurde anschließend in halbsäulenvolumen-Fractionen mit dem Elutionspuffer eluiert und entweder mit 10% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C bis zur Verwendung gelagert oder über Q-Sepharose weiter gereinigt.

Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄	Elutionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl		300 mM NaCl
	10 mM Imidazol		200 mM Imidazol
	pH 8,0		pH 8,0

Eine höhere Imidazolkonzentration im Waschpuffer führte bereits zur teilweisen Elution des Enzyms und konnte daher nicht verwendet werden.

2.3.4 Weitere Reinigung der (His)₆-15-LOX über Q-Sepharose

Um eine Bindung des Enzyms an Q-Sepharose zu ermöglichen, musste die Imidazol- und Salzkonzentration der Enzymlösung nach der Ni-Agarose Reinigung verringert werden. Als am effektivsten wurde eine 1:50 Verdünnung mit 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,4 mit 10% Glycerin ermittelt. Eine Dialyse war weniger geeignet, da zum einen das Enzym

längere Zeit 4°C ausgesetzt gewesen wäre (Verlust der Aktivität), zum anderen es bei konzentrierten Proben zu Proteinpräzipitation kam. Die verdünnte Enzymlösung wurde über 200 µl Q-Sepharose pro Liter Ausgangskultur in einer Polypropylensäule gegeben, mit dem fünffachen Säulenvolumen Tris/Glyzerin-Puffer gewaschen und das Enzym in Halbsäulen-Fractionen mit 120 mM KCl in Tris/Glyzerin-Puffer eluiert. Weitere gebundene Proteine wurden mit vier Säulenvolumen 1 M KCl in Tris/Glyzerin-Puffer eluiert. Die Enzymfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.5 Einführung von Mutanten in das His-tag Expressionssystem

Die cDNA der positionsspezifitätverändernden Mutanten lag in dem Arbeitskreis bereits vor. Die relevanten LOX-Fragmente konnten daher mit geeigneten Restriktionsenzymen herausgeschnitten und in den analog behandelten 15-LOX-pQE-9 Vektor ligiert werden.

F353L mit Kpn I und Dra III → ca. 1300 bp

I418A mit Kpn I und Dra III → ca. 1300 bp

I593A mit Dra III und Hind III → ca. 400 bp

Eine Transformation dieser Konstrukte und der Mutanten, die über die Überlappungs-Verlängerungs-Technik erzeugt wurden, erfolgte analog zum Wildtyp in M15[prep4]-Zellen. Ebenso entspricht das weitere Vorgehen zur Enzympräparation dem der (His)₆-15-LOX.

Bei Mutanten, für deren Erzeugung das QuikChange Site-Directed-Mutagenesis-Kit verwendet wurde, erfolgte eine Transformation in XL-1 Blue-Zellen. Da aus diesen Zellen eine vergleichbare Enzymmenge gewonnen werden konnte, wie aus den M15[prep4]-Zellen, wurde auf eine Umklonierung verzichtet. Die Expression des Enzyms erfolgte analog mit Medien, die nur Ampicillin als Antibiotikum enthielten.

2.3.6 Expression der 5-LOX

Eine zur Expression der 15-LOX analoge Strategie für die humane 5-LOX gelang nicht, da das entsprechende His-tag-5-LOX-Fusionsprotein katalytisch inaktiv war. Die 5-LOX wurde daher über das Expressionsplasmid pkk5LOX in Top10 Zellen gewonnen:

Die Expression der 5-LOX erfolgte analog zur 15-LOX, jedoch wurde bereits bei einer optischen Dichte von OD₆₀₀=0,6-0,8 die Enzymexpression durch Zusatz von 1 mM IPTG

induziert. Die weitere Inkubation erfolgte bei 30°C über Nacht. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und nach Waschen mit PBS in 2 ml Puffer A pro Liter Ausgangskultur aufgenommen. Nach Zellyse durch Ultraschall wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand entweder als Enzympräparation eingesetzt oder über ATP-Sepharose gereinigt. Hierzu wurde die Sepharose zunächst mit Puffer C beladen und mit Puffer A gewaschen, um ungebundenes ATP zu entfernen. Anschließend wurde das Bakterienlysate auf die Säule gegeben, mit 10 ml Puffer B gewaschen und die 5-LOX mit 12 ml Puffer C in 2 ml Fraktionen eluiert. Analog wurde die 5-LOX-vierfach-Mutante F359W,A424I, N425M,A603I gereinigt.

Puffer A:	Puffer B:	Puffer C:
50 mM Tris/HCl pH 7,3	Puffer A	Puffer A
2 mM EDTA	+ 1 M NaCl	+ 100 mM NaCl
10 mM Merkaptoethanol		+ 15 mM ATP

2.3.7 Glyzerinkulturen

Zur Sicherung der Lipxygenase-exprimierenden bakteriellen Klone wurden jeweils Glyzerinkulturen angelegt. Hierzu wurde 1 ml einer Übernacht-Schüttelkultur mit 1 ml Glyzerinkultur-Lösung gemischt und zu 250 µl Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Glyzerinkultur-Lösung: 65% Glyzerin
 0,1 M MgSO₄
 0,025 M Tris-HCl pH 8,0
 Lösung autoklavieren

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Messung der Lipxygenaseaktivität

2.4.1.1 Photometrischer Aktivitätsassay

Photometrische Messungen wurden an dem Spektrophotometer UV-160 A der Firma Shimadzu durchgeführt. Dabei wurde die zeitabhängige Absorptionszunahme bei dem Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes, 235 nm für konjugierte Diene, und einer

Temperatur von 20°C verfolgt. Der Standardassay bestand aus 950 µl Phosphatpuffer pH 7,4, dem Enzym und 50 µl Substratlösung (Endkonzentrationen Substrat 260 µM, Cholat 0,2%). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats gestartet und der Absorptionsverlauf nach kurzem Rühren gemessen. Für viele Messungen wurde auch eine Substratkonzentration von 100 µM ohne Cholat-Zusatz verwendet.

2.4.1.2 HPLC Aktivitätsassay

Die Umsetzung des Substrats (100 µM) mit LOX im Standardassay erfolgte in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 in einem Volumen von 500 µl für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die gebildeten Hydroperoxyverbindungen mit Natriumborhydrid reduziert, der pH-Wert mit konzentrierter Essigsäure auf 3-4 eingestellt und 500 µl Methanol zugegeben. Nach Vortexen und Zentrifugation (10 min 20000 g) wurde der Überstand direkt für die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) verwendet.

Für Umsätze mit der 5-LOX bzw. deren Mutanten wurde als Puffer PBS mit den Zusätzen 0,1 mM ATP, 0,1 mM EDTA und 12,5 µg/ml Dipalmitoylphosphatidylcholin verwendet.

Für die Aktivitätsuntersuchung einzelner Bakterienklone wurde das Pellet einer 5 ml Kultur (2.3.2) in 500 µl des entsprechenden Puffers resuspendiert und Bakterien nach Substratzugabe (100 µM) mit Ultraschall aufgeschlossen (50 W, 2 mal 15 Impulse, 0°C). Anschließend wurde wie für den Standardassay beschrieben weiterverfahren.

RP-HPLC wurde an einer HP-Chemstation mit einem HP 1040A Diodenarraydetektor durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Nucleosil C-18 Säule (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren) mit einer entsprechenden Vorsäule (30 x 4 mm). Das Laufmittel bestand aus Methanol/Wasser in unterschiedlichen Verhältnissen, meist 80/20, und 0,1% Essigsäure, die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte im Extinktionsmaximum der zu untersuchenden Verbindung:

- 235 nm konjugierte Diene (Hydro(pero)xyfettsäuren)
- 242 nm doppelt-konjugierte Diene (DiH(P)ETE)
- 270 nm konjugierte Triene (DiH(P)ETE)
- 300 nm konjugierte Tetraene (Lipoxine)
- 210 nm Fettsäuren

2.4.2 Produktanalyse

LOX-Produkte konnten häufig bereits in der RP-HPLC über den Vergleich der Retentionszeiten und der Absorptionsspektren mit denen von authentischen Standardsubstanzen identifiziert werden. Über Eichkurven erstellt mit Standardsubstanzen konnten die entsprechenden Verbindungen über die Flächen der detektierten Peaks quantifiziert werden.

Zur weiteren Analyse wurden einzelne Produkte aufgefangen und, nachdem das Laufmittel unter Vakuum verdampft wurde, der Normalphasen-HPLC (SP-HPLC), Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC) oder der Massenspektrometrie (MS) zugeführt.

2.4.2.1 Normalphasen-HPLC

Neben der Identifizierung der Produkte über Retentionszeit und Spektrum in der RP-HPLC ist es zum Teil notwendig, eine weitere Untersuchung von Produkten durchzuführen, die in der RP-HPLC nur unzureichend getrennt wurden. Dazu werden die zur Trockne eingeeengten Fraktionen aus der RP-HPLC in *n*-Hexan/0,1% Essigsäure aufgenommen und über die SP-HPLC weiter untersucht. Dies erfolgte über eine Nucleosil 100-7 Säule (250x4 mm, Machery-Nagel, Düren) mit einem SPD-M6A-Detektor (Shimadzu). Die Detektion erfolgte wie bei der RP-HPLC bei dem Extinktionsmaximum des untersuchten Produktes, in der Regel also bei 235 nm für konjugierte Diene (HETE, HODE). Als Laufmittel diente ein *n*-Hexan/Isopropanol Gemisch (unterschiedliche Verhältnisse, meist 2% Isopropanol) mit 0,1% Essigsäure und einer Flussrate von 1 ml/min.

2.4.2.2 Chiralphasen-HPLC

Produkte aus nicht-enzymatischen Reaktionen, z. B. aus Autoxidation, sind racemisch, während die LOX-Reaktion stereospezifisch abläuft unter Bildung von Produkten in der S-Konfiguration (Ausnahme R-LOX_n). Zur Überprüfung, ob tatsächlich ein LOX-Produkt vorliegt, musste also die Enantiomeren-Zusammensetzung bestimmt werden. Hierzu wurde das entsprechende aufgefangene und zur Trockne eingeeengte Produkt aus RP- oder SP-HPLC in *n*-Hexan/0,1% Essigsäure aufgenommen und der Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC) zugeführt. Hier erfolgte eine Trennung der Enantiomeren über chirale Säulen (Chiralcel OD bzw. OB, 250x4,6 mm, Diacel Chem. Industries, USA) mit dem Laufmittel *n*-Hexan/2-Propanol (wechselnde Zusammensetzung) und 0,1% Essigsäure. Die Flussrate

betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte bei der entsprechenden Wellenlänge (235 nm für konjugierte Diene) mit dem SPD-M6A Detektor (Shimadzu). Aufgrund gleicher Absorptionseigenschaften der beiden Enantiomere konnte deren Verhältnis aus den Peakflächen berechnet werden.

2.4.2.3 Massenspektrometrie

Die Strukturen der Produkte, für die es keinen authentischen Standard gab, der für die Cochromatografie in der HPLC verwendet werden konnte, wurden über Massenspektrometrie (MS) bestimmt.

LC/MS:

Hierzu wurden die HPLC gereinigten Substanzen in einem 1:1 Gemisch aus Methanol und 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 8.0 aufgenommen und über die Negativ-Ionen-Massenspektrometrie analysiert. Aliquots der Probe wurden mit 3 μ l/min in die auf 200°C erhitzte Injektions-Kapillare eines LCQ-Ionenfallen-Massenspektrometers (Thermoquest, Engelsbach) eingespritzt. Die Ionisierung der Proben erfolgte mittels Elektrospray bei 4 kV. Die Ionen wurden im negativ-Modus in einem Bereich von m/z 100-500 detektiert. Weitere Fragmentierung einzelner Molekül-Ionen (MS/MS) erfolgte bei einer Spannung zwischen 10 und 40 Volt.

GC/MS:

Für die Analyse von Produkten über GC/MS wurden diese zunächst über RP- bzw. SP-HPLC gereinigt. Anschließend mussten sie folgenderweise derivatisiert werden: Carboxylgruppen wurden mit Diazomethan verestert (2.8.3) und Hydroxygruppen mit Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid in trockenem Pyridin silyliert. Die Messungen wurden an einem Shimadzu GC/MS QP-2000 System, ausgerüstet mit einer fused silica Kapillare SPB 1 (30 m x 0,32 mm, Beschichtungsdicke 0,25 μ m), durchgeführt. Eine Injektor-Temperatur von 270°C, Ionenquellen-Temperatur von 180°C und Elektronen-Energie von 70 eV wurden eingestellt. Die Fettsäurederivate wurden mit folgendem Temperaturprogramm eluiert: 2 min 180°C isotherm, danach Erhöhung der Temperatur mit einer Rate von 5°C/min bis 290°C, abschließend 5 min isotherm bei 290°C.

Für weiterführende Analysen wurden vor der Silylierung der Hydroxygruppen Doppelbindungen der Fettsäurederivate hydriert. Dazu wurden 10 μ g der Fettsäure in 1 ml Ethanol

mit 5 mg Palladium/Aktivkohle als Katalysator versetzt und anschließend Wasserstoff für zwei Minuten bei Raumtemperatur hindurchgeleitet. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand in 20 µl Dodekan aufgenommen.

2.4.3 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Roti-Quant System (Roth, Karlsruhe), basierend auf der Methode nach Bradford, verwendet. Für die Eichung wurden verschiedene BSA-Konzentrationen im Bereich von 1 mg/ml bis 8 mg/ml verwendet.

2.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurde die Methode nach Laemmli angewandt (Laemmli, 1970). Es wurden 10% Mini-Gele verwendet und die Elektrophorese bei 27-30 mA durchgeführt. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine mit Coomassie und Trocknung des Gels oder ein Western Blot.

2.4.5 Western Blot

Proteine wurden nach Auftrennung über die SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran nach der semi-dry Methode geblottet (1 h, 10 V). Der Blot wurde mit 5% Magermilch in PBS/0,1% TWEEN-20 blockiert und mit dem ersten Antikörper inkubiert (1 h). Nach intensivem Waschen mit PBS/TWEEN kam als zweiter Antikörper ein Peroxidase-Konjugat zum Einsatz (Inkubationszeit 1 h). Der Blot wurde nach erneutem intensivem Waschen mit PBS/TWEEN mit dem Western-Lightning Chemilumineszenz Plus Reagenz behandelt und zwischen 1 s und 20 s auf einen Röntgenfilm (Kodak) gelegt. Für eine quantitative Auswertung wurde die Intensität der Banden auf dem Röntgenfilm unter Verwendung des Programms Phoretix 1D (Phoretix International, Newcastle, Großbritannien) densitometrisch bestimmt.

2.5 Bestimmung von Enzymeigenschaften

2.5.1 Kinetische Konstanten K_M und V_{Max}

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und V_{Max} erfolgte über ein Lineweaver-Burk-Diagramm. Hierzu wurde für verschiedene Substratkonzentrationen zwischen 5 und 150 μM ein photometrischer Aktivitätsassay durchgeführt und die linearen Anfangsgeschwindigkeiten des Substratumsatzes gemessen. Für jede Substratkonzentration wurden mindestens drei Messungen durchgeführt und die Standardabweichungen bestimmt. Aus der doppelt reziproken Auftragung von Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit (Lineweaver-Burk-Diagramm) wurden die kinetischen Konstanten durch Extrapolation ermittelt.

2.5.2 pH-Optimum

Es wurde jeweils ein Standard-Aktivitätsassay bei verschiedenen pH-Werten zwischen 6 und 11 durchgeführt und Produkte über die RP-HPLC quantifiziert. Als Puffer wurden für pH-Werte zwischen 6 und 9 Phosphat-Borat-Puffer nach Kolthoff eingesetzt, für höhere pH-Werte Borat-Puffer nach Sørensen.

2.5.3 Substratspezifität

Zur Bestimmung der Substratspezifität der 15-LOX und deren Mutanten wurden photometrische Aktivitätsassays (2.4.1.1) mit verschiedenen Substratfettsäuren (100 μM) durchgeführt. Aus dem linearen Abschnitt des Absorptionsverlaufs bei 235 nm wurde die jeweilige Umsatzrate bestimmt. Zur Ermittlung der Positionsspezifität wurden Produkte über RP-HPLC aufgetrennt (2.4.1.2).

Die Substratspezifität der 5-LOX und deren Mutanten wurde ausschließlich über die HPLC ermittelt (2.4.1.2). Auch hier wurden die verschiedenen Fettsäuren jeweils in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt.

2.6 Untersuchungen mit Hemmstoffen

2.6.1 Bestimmung von IC_{50} -Werten

Eine Größe für die Messung der inhibitorischen Wirkung eines Stoffes ist der sogenannte IC_{50} -Wert. Dieser Wert gibt die Hemmstoffkonzentration an, bei der nur noch 50% der ursprünglichen Enzymaktivität vorhanden sind. Für die Ermittlung ist also immer die Bestimmung der ungehemmten Enzymaktivität zur Normierung notwendig. Darüber hinaus werden verschiedene Hemmstoffkonzentrationen eingesetzt, aus denen sich die Halbhemmungskonzentration inter- bzw. extrapolieren lässt. Hier wurde für die Bestimmung der Enzymaktivität der photometrische Aktivitätsassay eingesetzt (2.4.1.1), wobei Enzym (29 nM native 15-LOX) und Hemmstoff für 30 s vorinkubiert wurden und der Reaktionsstart durch Zugabe von Substrat (260 μ M Linolsäure) erfolgte.

2.6.2 Untersuchungen zum Hemmmechanismus von Ebselen

Zur Bestimmung des Hemmmechanismus von Ebselen wurden Kinetiken bei unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen am Photometer aufgenommen (2.5.1). Dabei erfolgte die Zugabe des Ebselens als konzentrierte Lösung in Methoxyethanol, so dass die Lösungsmittelkonzentration immer unter 2% blieb, wodurch die LOX-Reaktion nicht beeinflusst wurde. Es erfolgte entweder eine Inkubation der Grundzustands-Fe[II]-LOX (29 nM) mit Ebselen (0-1 μ M) für 30 s vor dem Reaktionsstart durch Zugabe des Substrats, oder es wurden Substrat und Ebselen (0-10 μ M) vorgelegt und durch LOX-Zugabe (29 nM) gestartet (keine Vorinkubation). Die für beide Varianten aufgenommenen Kinetiken wurden jeweils in einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen, aus dem über den Schnittpunkt der Grafen die Art der Hemmung, kompetitiv oder nicht-kompetitiv, ermittelt wurde.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Glutathion auf die Hemmung der Fe[II]-LOX untersucht, indem ein 300facher molarer Überschuss Glutathion entweder vor oder nach der Vorinkubation von Ebselen und LOX zugesetzt wurde.

Die Untersuchung einer möglichen Modifizierung von Ebselen erfolgte über RP-HPLC. Ebselen und dessen Metabolite wurden über eine Nucleosil C-18-Säule (KS-System, 250 x 4 mm, Partikelgröße 5 μ m, Machery-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) mit einem Laufmittel bestehend aus Methanol/Wasser/Essigsäure im Verhältnis 55/45/0,1 und einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt. Die Absorption bei 325 nm wurde gemessen.

2.6.3 Bestimmung der Ebselen/LOX-Stöchiometrie und der Bindungsverhältnisse

Zur Überprüfung, ob Ebselen kovalent an die 15-LOX bindet, wurden Versuche mit ^{14}C -Ebselen durchgeführt. Dazu wurde die native 15-LOX (32 nM) mit 0, 0,5 und 2 nmol ^{14}C -Ebselen für 5 min in 1 ml 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 7,0 inkubiert. Anschließend wurde der Puffer unter Vakuum verdampft und der Rückstand in Elektrophorese-Probenpuffer ohne Merkcaptoethanol aufgenommen. Aliquots wurden für die SDS-PAGE eingesetzt (2.4.4). Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und für die Exposition eines Röntgenfilms verwendet. Ein Kontrollexperiment wurde mit Merkcaptoethanol im Probenpuffer durchgeführt.

2.6.4 Dialyse

Um die Stöchiometrie der 15-LOX-Ebselen-Wechselwirkung zu bestimmen, wurden Dialyseexperimente durchgeführt. Hierzu wurde die native 15-LOX (380 nM) mit ^{14}C -Ebselen (8 μM) in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 für 2 min inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz gegen 2 l des gleichen Puffers dialysiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (0-30 h) Aliquots aus dem Dialyseschlauch entnommen. Die Radioaktivität in diesen Aliquots wurde durch Flüssig-Szintillationszählung bestimmt und das Verhältnis von Ebselen zu LOX ermittelt (spezifische Radioaktivität des ^{14}C -Ebselens: 8 Ci/mol). In einem zweiten Dialyseexperiment wurde dem Dialysepuffer 1 mM Glutathion zugesetzt.

2.6.5 Untersuchungen zur Strukturaufklärung

2.6.5.1 Grundlagen der Röntgenabsorptionsspektroskopie

Eine geeignete Methode zur Untersuchung der Ligandensphäre von Metallen stellt die Röntgenabsorptionsspektroskopie dar, wenn bereits Kenntnisse über die vermutlichen Geometrien vorliegen. Hiermit können Anzahl und Entfernung der Metallliganden bestimmt werden, jedoch nur bedingt deren Typ (Stickstoff, Sauerstoff usw.). Im Fall von verdünnten Proben und damit auch der Untersuchung von Ligandensphären in biologischen Proben wird die Fluoreszenz gemessen. Der Verlauf dieser Spektren ist im Wesentlichen identisch zu den Absorptionsspektren.

Grundlage ist die Absorption von Röntgenstrahlung durch innere, d.h. kernnahe, Elektronen (z. B. 1s) eines Metalls und damit deren Anregung. Erreicht die Röntgenstrahlung eine

bestimmte Energie, wird ein Elektron ins Kontinuum promoviert, d.h. es wird aus dem Atom 'herausgeschlagen'. Bei dieser Energie tritt eine Kante (edge) im Absorptionsspektrum auf (Abb. 10). Vor dieser Kante (pre-edge) werden Absorptionseffekte beobachtet, die auf einer Anregung von kernnahen Elektronen auf höhere Energieniveaus beruhen. Die Lage der Kante und der Bereich kurz vor bis kurz nach der Kante liefern Informationen über die Art des Metallatoms (z. B. Eisen, Kupfer usw.), dessen Oxidationszustand (z. B. Fe[II], Fe[III]) sowie Anzahl und Geometrie der Liganden (XANES, X-ray Absorption Near Edge Structure). Der Bereich ca. 30 bis maximal 1000 eV oberhalb der Absorptionskante (erweiterte Region) weist eine Feinstruktur auf, aus der die Abstände der Liganden bestimmt werden können (EXAFS, Extended X-ray Absorption Fine Structure).

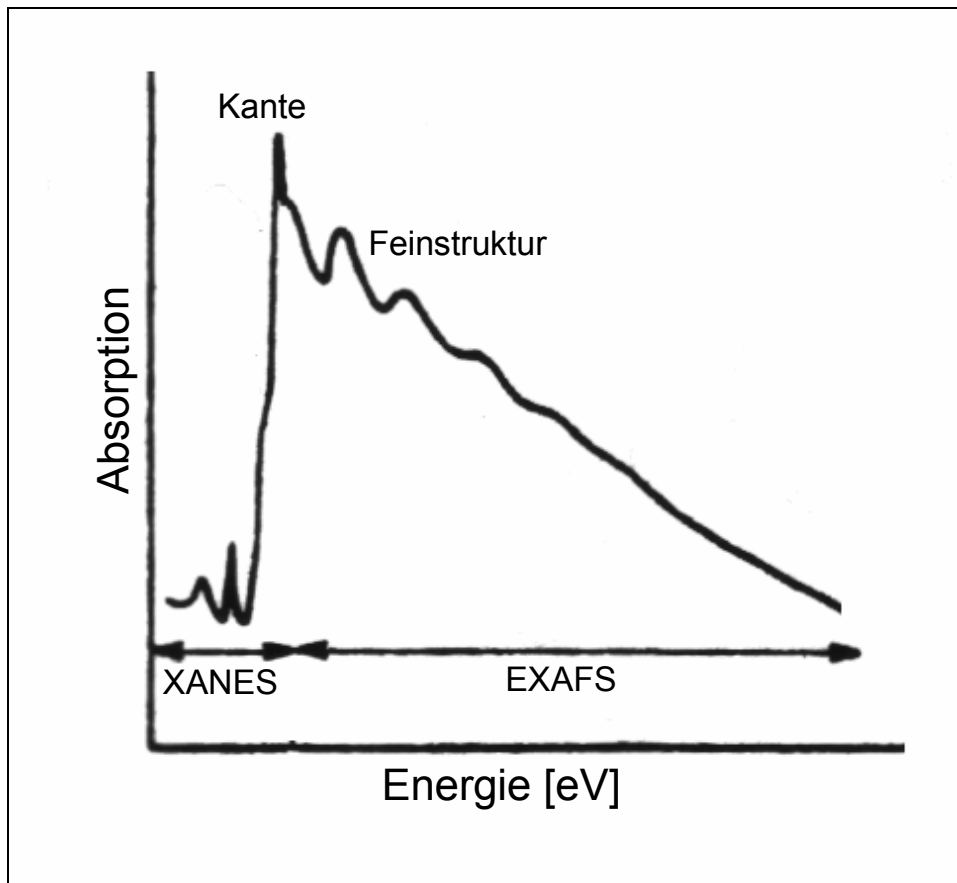


Abb. 10: Beispiel eines Absorptionsspektrums mit der Kantenregion. Der Bereich um die Absorptionskante wird in der XANES-Spektroskopie ausgewertet, die Feinstruktur der erweiterten Region ist für EXAFS-Untersuchungen wichtig.

Diese Feinstruktur geht auf ein Interferenz-Phänomen zurück. Das durch Absorption der Röntgenstrahlung einer Energie knapp oberhalb der Absorptionskante emittierte Photoelektron breitet sich gemäß der Quantenmechanik als Welle aus (Wellenlänge $\lambda_{\text{Elektron}}$,

Abb. 11) und kann somit an benachbarten Atomen gestreut werden. Dabei kommt es bei der Überlagerung von zurückgestreuter und ausgehender Welle durch Phasenverschiebung zu Interferenzen. Die Wellen können sich am Absorberatom (hier Eisen) konstruktiv (resultierendes Maximum, Abb. 11a) oder negativ überlagern (resultierendes Minimum, Abb. 11b). Das entstehende Absorptionsmuster, die Feinstruktur, ist charakteristisch für die Art der zurückstreuenden Atome sowie deren Abstand zum Ursprung der ausgehenden Welle (dem Metallatom). Dies macht man sich in EXAFS-Untersuchungen zu Nutze.

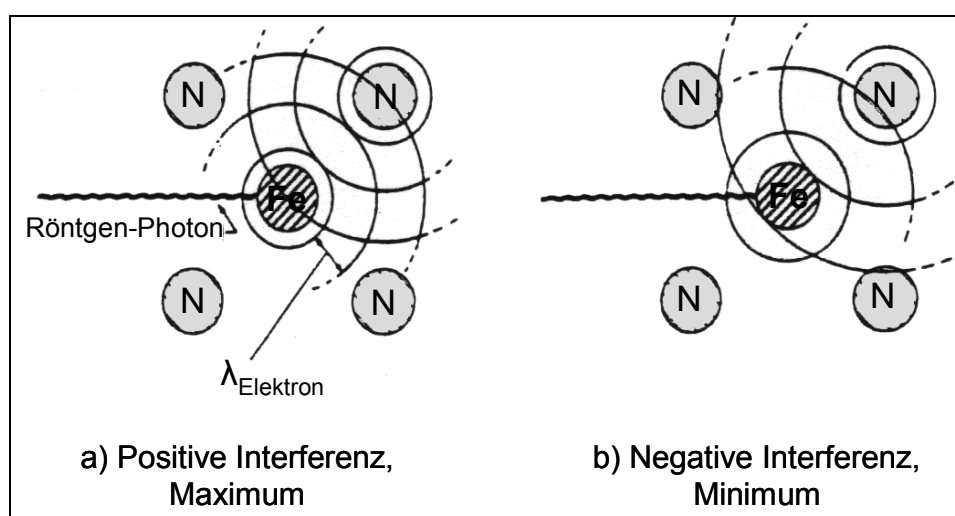


Abb. 11: Entstehung der Röntgenabsorptions-Feinstruktur am Beispiel eines Eisenatoms mit Stickstoff-Liganden. Emittierte und zurückgestreute Welle überlagern sich, wodurch sich das Absorptionsmuster bildet.

2.6.5.2 Durchführung der EXAFS-Messungen

4 ml einer 40 μM Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX-Lösung wurden mit einem zehnfachen molaren Überschuss Ebselen für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, was zu einer mehr als 90%igen Inaktivierung führte. Anschließend wurde ungebundenes Ebselen durch Gelfiltration entfernt (Econopak PD-10 Säulen, Pharmacia, Uppsala, Schweden) und der Puffer wurde gegen einen flüchtigen Ammoniumbicarbonat-Puffer pH 7,0 ausgetauscht. Nach Lyophilisierung wurde die Probe in die Plastikmesszelle überführt und bis zur Messung bei -80°C gelagert. Analog wurde mit einer LOX-Referenz-Probe (keine Ebselen-Behandlung) verfahren. Die Röntgenabsorptions-Untersuchungen wurden am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) bei HASYLAB (Deutsches Elektronen Synchrotron, Hamburg) von Dr. R. Wiesner und J. Rathmann (Institut für Biochemie,

Charité, Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt. Eine absolute Energie-Einteilung wurde durch eine Kalibrierungstechnik nach Pettifer und Hermes eingeführt, die zu einer Genauigkeit besser als 0,2 eV führte (Pettifer und Hermes, 1985). Es wurden Serien von 32 Spektren für die Ebselen-behandelte Probe, bzw. 25 für die LOX-Referenz aufgenommen. Der Messbereich lag zwischen 6900 und 7900 eV, in der Nähe der Absorptionskante wurde die Energie in 0,3 eV Schritten erhöht. Aus Vergleichen von erstem und letztem Spektrum einer Serie konnte keine Schädigung der Proteinproben während der Messungen festgestellt werden.

In Abb. 12 ist der Aufbau für EXAFS-Messungen dargestellt. Aus Synchrotron-Strahlung wird die entsprechende monochromatische Welle über zwei Silizium(III)-Kristalle herausgefiltert und harmonische Wellen höherer Ordnung durch Regulation des zweiten Kristalls minimiert. Die Probe befindet sich in einer Plastikzelle, deren Messfenster von einer Kaptonmembran verschlossen sind. Sie wird auf 20 K gekühlt, um Schädigungen der Probe und Atombewegungen zu minimieren. Es werden sowohl Fluoreszenz als auch Absorption gemessen.

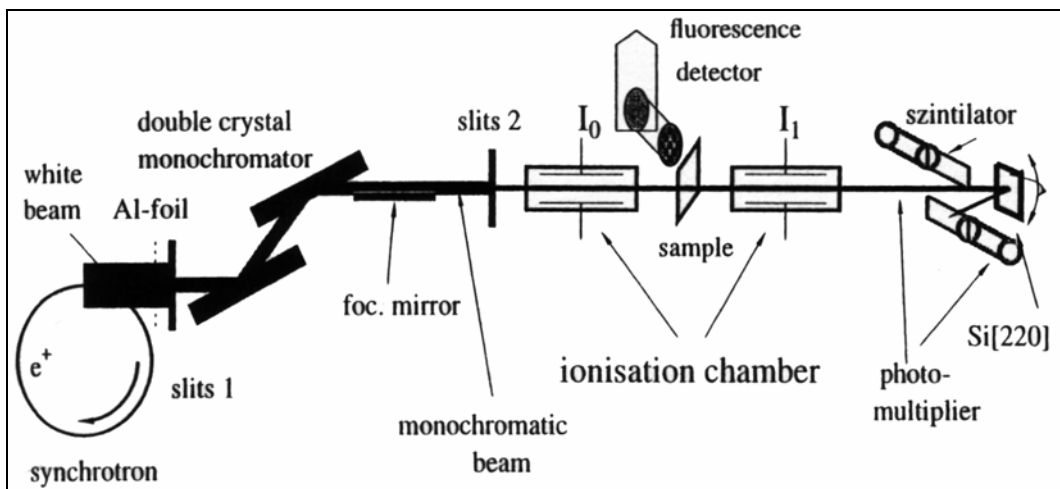


Abb. 12: Instrumenteller Aufbau für EXAFS-Messungen (nach W. Meyer-Klaucke, EMBL).

2.6.5.3 Datenreduktion und Auswertung der EXAFS-Spektren

Zur Extraktion der Spektren aus den Rohdaten wurde ein Programmpaket von H.-F. Nolting und C. Hermes verwendet (EXPROG: EMBL EXAFS data analysis and evaluation program package for PC/AT, H.-F. Nolting und C. Hermes, 1992). Hiermit wurden die Spektren auf Artefakte untersucht, normiert und energiekalibriert. Die Werte der verbliebenen Fluoreszenzkanäle wurden anschließend addiert und gemittelt. Aus dem so

erhaltenen Spektrum wurde die Feinstruktur extrahiert, indem eine lineare Funktion an den Untergrund vor der Kante und eine Spline-Funktion mit wenigen Knoten oberhalb der Kante angepasst wurde.

Die Auswertung der EXAFS-Spektren erfolgte mit dem Excurve Programm (Version 92, CCLRC Daresbury Laboratory, Warrington, England). Zunächst wurde das theoretische Spektrum eines Modells (2.8.1) berechnet, welches anschließend durch Variation verschiedener Parameter an das experimentelle Spektrum angepasst wurde. Dabei wurden die Spektren mit k^2 gewichtet. Der Amplitudenreduktionsfaktor wurde konstant gehalten (0,8), die Fermi-Energie freigegeben. Imidazolringe wurden zunächst nur als Ganzes in ihrem Abstand variiert. Für sie wurde Mehrfachstreuung verwendet.

2.6.6 Modellierung der Hemmkinetik

Das Modell für die Kinetik der Hemmung der LOX durch Ebselen wurde in Kooperation mit Dr. Holzhütter, Institut für Biochemie, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, erstellt. Für den Fit der beiden Gleichungen (1) und (2) (3.2.2.5) an die experimentellen Daten wurde das SIMFIT Software-Paket verwendet.

2.7 Untersuchungen zu Membranbindungseigenschaften der 15-LOX

2.7.1 Membranbindungsassay

Die eingesetzten gereinigten Enzyme wurden zur Abtrennung von Präzipitationen 10 min bei 4°C und 20000 g zentrifugiert. Es folgte eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur von 1 µg (bzw. 2,5 µg) LOX mit 200 µg SMP als Modellmembranen in 50 mM HEPES Puffer pH 7,4 mit 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT. Das Gesamtvolumen betrug 25 µl. Anschließend wurden die Proben auf 100 µl eines Sacharose-Kissens (500 mM Sacharose in dem gleichen Puffer) gegeben und in einer Beckmann Tabletop Ultrazentrifuge für 15 min bei 100000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet beinhaltet den membrangebundenen Teil der LOX und wurde in 25 µl zweifach Probenpuffer (Roti Load, Roth, Karlsruhe) aufgenommen. Der zuvor vorsichtig abgenommene Überstand wurde zur besseren Handhabung mit einer Ovalbumin-Lösung versetzt (Endkonzentration 60 µg/ml) und Proteine mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%) gefällt. Nach Zentrifugation

(20000 g, 20 min, 4°C) wurde das Pellet ebenfalls in 25 µl zweifach Probenpuffer aufgenommen und Aliquots (10 µl) der 20000g und 100000 g Pellets in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.4). Als Kontrolle erfolgten analoge Versuche ohne Membranzugabe. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt (2.4.5). Als erster Antikörper wurde ein RGS-His-Antikörper in der Verdünnung 1:4000 verwendet, als zweiter kam ein Peroxidase gekoppelter anti-Maus-IgG Antikörper, ebenfalls in der Verdünnung 1:4000, zum Einsatz. Nach Behandlung mit dem Western-Lightning Chemilumineszenz Plus Reagenz und Exposition eines Röntgenfilms wurden die Anteile der 15-LOX in Pellet und Überstand densitometrisch bestimmt (2.4.5) und miteinander verglichen.

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Membranbindung wurde die LOX mit SMP inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min bis 2 h) jeweils der membrangebundene Enzymanteil bestimmt.

2.7.2 Umsatz von biologischen Membranen

Die jeweilige LOX-Spezies wurde mit 0,5 mg SMP in PBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 500 µl. Zur Kontrolle erfolgte eine Inkubation ohne Enzym. Die Reaktion wurde mit Methanol gestoppt, Peroxide mit Natriumborhydrid reduziert und nach Einstellung eines sauren pH-Wertes mit Essigsäure, die Lipide nach der Methode von Bligh-Dyer (Bligh und Dyer, 1959) extrahiert. Anschließend erfolgte eine alkalische Hydrolyse der extrahierten Lipide mit 6% methanolischer KOH unter Argon-Atmosphäre bei 60°C für 30 min. Nachdem mit konzentrierter Essigsäure ein saurer pH-Wert eingestellt und Präzipitate abzentrifugiert wurden (10 min, 20000 g, 4°C), konnten Aliquots der Probe direkt in der RP-HPLC verwendet werden. Zur besseren Quantifizierbarkeit und Vergleichbarkeit verschiedener Proben wurde in einigen Fällen das Hydroxyfettsäure/Fettsäure-Verhältnis für Linolsäure und Arachidonsäure und deren Derivate bestimmt.

2.7.3 Bestimmung der Membranoxygenaseaktivität über Quantifizierung der Freisetzung luminaler Proteine

Neben der Quantifizierung der gebildeten Hydroxyfettsäuren aus Biomembranen als Substrat wurde noch ein weiteres Experiment zur Untersuchung der Membranoxygenaseaktivität von LOX-Mutanten gewählt. Die Inkubation von EKRM mit der 15-LOX führt

zu einer Durchlässigkeit der Membran, so dass luminal Proteine freigesetzt werden. Dadurch sind sie im Überstand eines Sedimentationsversuchs nachweisbar, wohingegen sie bei intakten Membranen nur im Pellet zu finden sind. Für die Messung der Membranoxygenaseaktivität wird die Quantifizierung der Freisetzung des luminalen Enzyms Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) aus EKRM herangezogen.

Da viele der Mutanten eine veränderte Fettsäureoxygenaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp besaßen, wurde als Normierung die Linolsäureoxygenierung verwendet. Hierzu wurden die Linolsäureumsätze mit dem entsprechenden Enzym nach einer Minute am Photometer bestimmt (2.4.1.1) und für die nachfolgenden Experimente die gleiche Linolsäureoxygenaseaktivität eingesetzt. Die jeweilige LOX-Spezies wurde mit EKRM bei 26°C unter leichtem Schütteln in 50 mM HEPES Puffer pH 7,4 mit 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT inkubiert (Gesamtvolumen 100 µl). Als Kontrolle diente ein analoger Ansatz ohne Enzymzugabe. Aliquots (25 µl) wurden nach 30 min, 120 min und 240 min entnommen und wie unter 2.7.1 für den Membranbindungsassay beschrieben weiter verfahren (Ultrazentrifugation, TCA-Fällung, SDS-Gel, Western Blot). Im Western Blot wurde zunächst ein anti-PDI-Antikörper aus Kaninchen in der Verdünnung 1:4000 verwendet, als zweiter Antikörper diente ein Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen-IgG Antikörper, ebenfalls in der Verdünnung 1:4000. Die Quantifizierung der Banden erfolgte analog zu 2.7.1 über Chemilumineszenz und densitometrische Messung.

2.8 Verschiedene Methoden

2.8.1 Modellierung der Struktur der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX

Zur Erstellung von Modellen der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX und der Sojabohnen LOX-1 mit gebundener Arachidonsäure bzw. Ebselen im aktiven Zentrum wurde das Programm Hyperchem 4.0 für SGI bzw. 5.0 für Windows verwendet. Nachdem die Arachidonsäure bzw. das Ebselen in die Bindungstasche hineinmodelliert wurde, erfolgte eine Energieminimierung des Moleküls und der umliegenden Aminosäureseitenketten.

Für die Vervollständigung der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX-Kristallstruktur, d.h. die Hineinmodellierung der fehlenden Aminosäuren, wurde das Programm Swiss-PdbViewer 3.7 (Guex und Peitsch, 1997) verwendet. Für die eingefügten Aminosäuren wurde eine Energieminimierung (conjugate gradients) durchgeführt. Die Abbildungen 37 und 39

wurden mit dem Programm VMD (Humphrey et al., 1996) erstellt.

2.8.2 Anfertigen von Sequenzvergleichen und Erstellung von Restriktionskarten

Sequenzvergleiche (Alignments) auf Protein- und DNA-Ebene wurden mit dem Programm ClustalW des European Bioinformatics Institute (EBI) unter Verwendung der Standardeinstellungen durchgeführt. Dieses Programm ist auch in der Lage, einen Vergleich mehrerer Sequenzen, beispielsweise aller tierischen LOXn, zu erzeugen (multiple alignment).

Restriktionskarten der Expressionsplasmide wurden mit den Programmen DNA-Strider, Version 1.0, und DNAssist, Version 1.03, erstellt.

2.8.3 Darstellung von Diazomethan und Veresterung von Carboxylgruppen

Alle Arbeiten wurden unter einem Abzug durchgeführt. 100 ml Diethylether wurden mit 35 ml gekühlter 40%iger Kalilauge unterschichtet. In einem Eisbad wurden unter Schwenken in kleinen Portionen 0,1 mol Nitrosomethylharnstoff eingebracht und anschließend, 10 min nach der letzten Zugabe, die etherische Diazomethanlösung abgegossen. Nach Trocknung über festem Kaliumhydroxid für ca. 3 h wurde die Lösung bei -20°C gelagert.

Für die Veresterung von Carboxylgruppen wurde zu einer methanolischen Fettsäure- bzw. Hydro(pero)xyfettsäurelösung unter einem Abzug auf Eis etherische Diazomethanlösung gegeben, bis die Gelbfärbung über mehrere Minuten konstant blieb. Anschließend wurde der Diethylether mit Stickstoff verblasen. Auf diese Weise veresterte Fettsäuren wurden für den Einsatz als Substrat über HPLC gereinigt. Die nach dem LOX-Umsatz methylierten Hydro(pero)xyverbindungen wurden über HPLC bzw. MS identifiziert bzw. für den Vergleich von Produkten aus dem Umsatz mit LOXn herangezogen.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX zur Vereinfachung nur LOX oder 15-LOX und die humane 5-LOX nur 5-LOX genannt. Obwohl die LOX-Produkte Peroxide sind, wurden diese fast ausschließlich als reduziertes, stabileres Hydroxid analysiert. Daher werden Produkte zum Teil auch als Hydroxy-Produkt (OH-Produkt) angegeben, obwohl streng genommen das jeweilige Peroxid entstand.

3.1 Enzymreinigung und Charakterisierung

3.1.1 Die Reinigung der (His)₆-15-LOX führt zu einem mehr als 95% reinen Enzym

Die 2-Schritt-Reinigungsstrategie für das His-tag-LOX-Konstrukt über Nickel-Agarose und Q-Sepharose stellt eine einfache und schnelle Möglichkeit dar, saubere Enzymfraktionen zu erhalten. Auf diese Weise kann etwa 1 mg nahezu reines Protein aus einem Liter Bakterienkultur gewonnen werden.

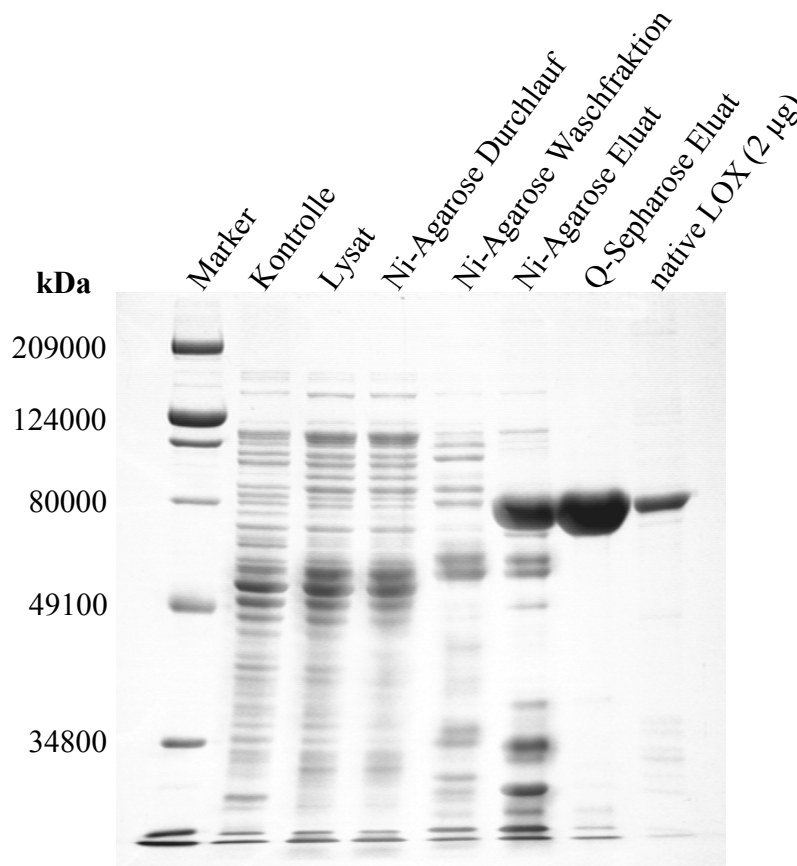


Abb. 13: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel der Reinigung der (His)₆-15-LOX vom Bakterienlysat über Ni-Agarose bis zur Q-Sepharose-Elutionsfraktion. Auf jede Spur wurden 20 µg Protein aufgetragen.

Abb. 13 zeigt ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der LOX-Reinigung vom Bakterienlysat bis zur Q-Sepharose-Elutionsfraktion. Dabei wurde in jeder Spur die gleiche Menge Protein (20 μg) aufgetragen. Zusätzlich wurden als Standard 2 μg der aus Kaninchenblut gereinigten nativen LOX und eine uninduzierte Kontrolle (ohne IPTG-Zugabe) aufgetragen.

In Abb. 14 sind die Q-Sepharose-Elutionsfraktionen für verschiedene LOX-Mutanten dargestellt. Es wurde mit jeweils 5 μg Protein eine SDS-PAGE durchgeführt und mit Coomassie angefärbt. Wie deutlich zu erkennen ist, führte die Reinigung aller Enzyme zu einem nahezu reinen Protein. Die Trunktionsmutante (C-Term) besitzt ein geringeres Molekulargewicht als die übrigen Enzyme (ca. 63 statt 75 kDa), da ihr die N-terminale Domäne fehlt (s. 3.3.1).

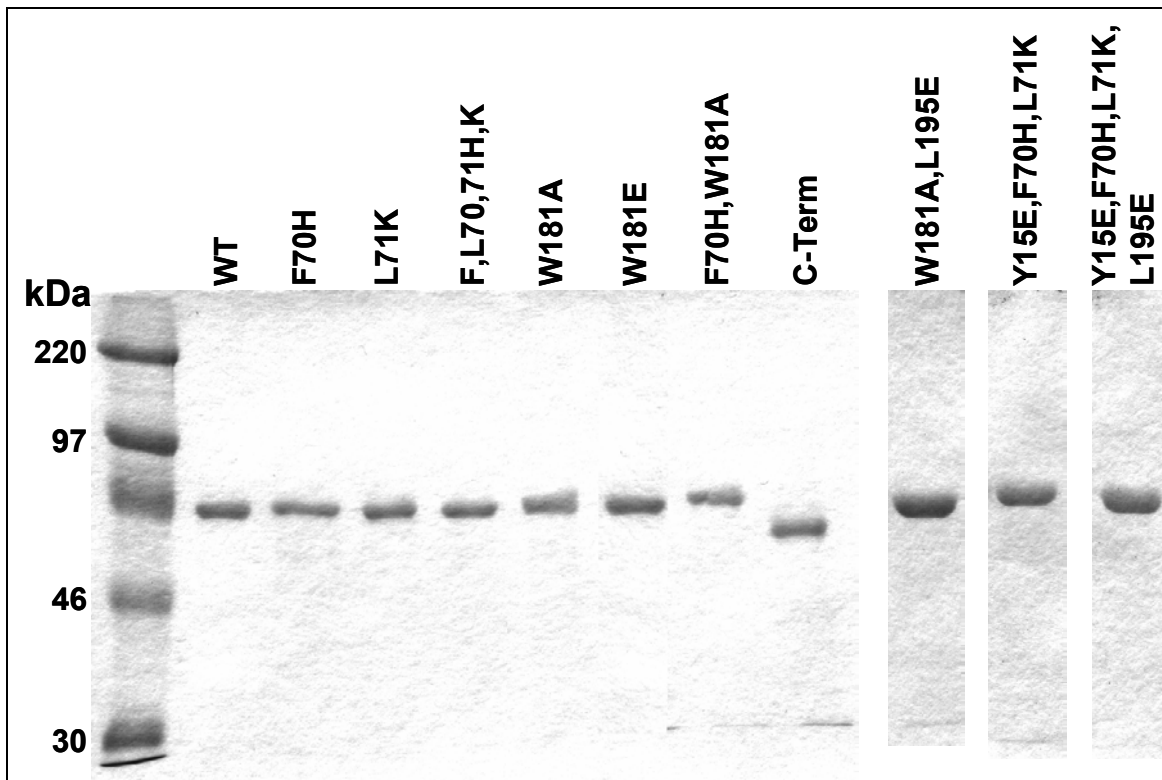


Abb. 14: SDS-Gelelektrophorese der gereinigten $(\text{His})_6$ -15-LOX-Mutanten. Es wurden jeweils 5 μg Protein aufgetragen und mit Coomassie angefärbt. Alle Enzymfraktionen sind nahezu frei von Fremdproteinen. Die Trunktionsmutante (C-Term) besitzt ein geringeres Molekulargewicht, da ihr die N-terminale Domäne fehlt.

3.1.2 Die Wildtyp-(His)₆-15-LOX hat die gleichen enzymatischen Eigenschaften, wie das native Enzym

Um sicherzustellen, dass die mit dem His-tag einhergehende Veränderung des LOX-N-Terminus (zusätzliche 13 Aminosäuren) nicht wesentliche enzymatische Eigenschaften verändert, wurden diese überprüft. Die Produktanalyse des Umsatzes von Arachidonsäure durch die (His)₆-15-LOX mittels HPLC ergab, dass die Positionsspezifität und die Chiralität der Produkte identisch sind zur WT-LOX (Abb. 15). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Linolsäure als Substrat erzielt (ohne Abbildung).

Auch die kinetische Enzymcharakterisierung ergab keine nennenswerten Unterschiede. Die K_M -Werte und die spezifische Aktivität (turnover) der beiden LOX-Spezies waren vergleichbar. Das pH-Profil zeigte ebenfalls keine Verschiebung des Optimums, welches zwischen pH 7 und pH 7,5 liegt (ohne Abbildung).

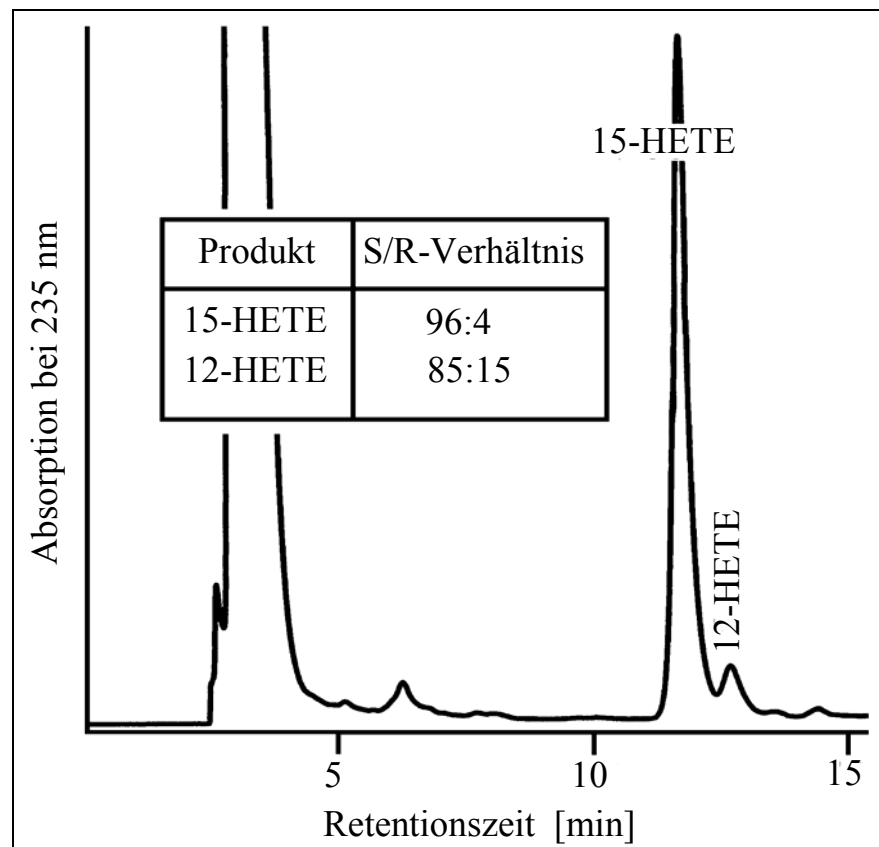


Abb. 15: RP-HPLC-Chromatogramm des Arachidonsäureumsatzes mit (His)₆-15-LOX. Einschub: Enantiomer-Zusammensetzung der Produkte 15-HETE und 12-HETE ermittelt über CP-HPLC. Die Ergebnisse sind identisch zu denen des WT (ohne Abb.).

3.2 Untersuchungen zum aktiven Zentrum der 15-LOX

3.2.1 Enzym-Substrat-Wechselwirkungen

Von grundlegender Bedeutung für die LOX-Reaktion ist die Wechselwirkung des Enzyms mit dem Substrat. Die Bindung der Fettsäure am aktiven Zentrum hat einen entscheidenden Einfluss auf die Positionsspezifität und die Reaktivität des Enzyms. Hierbei spielen zwei Dinge eine wesentliche Rolle: Die Beschaffenheit der Bindungstasche, insbesondere ihres Volumens, und die Art des Substrats. Für 12- und 15-LOXn ist allgemein akzeptiert, dass die Positionsspezifität auf unterschiedliche Volumina der Bindungstaschen zurückgeht. So ist die Bindungstasche der 12-LOX etwas größer als die der 15-LOX, wodurch das Substrat mit dem Methylende tiefer hinein gelangen kann. Dadurch findet die Oxygenierung näher am Carboxylende statt als bei der 15-LOX (vergl. Abb. 8). Als Positions-determinanten der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX wurden die Aminosäuren F353, I418 und I593 identifiziert (s. 1.5.3).

Anders bei der 5-LOX: Hier existieren zwei unterschiedliche Erklärungsansätze für die Positionsspezifität, die auf der Bindung des Substrats beruhen. Nach der Orientierungstheorie wird das Substrat bei der 5-LOX invers, d.h. mit dem Carboxylende in der Tasche gebunden. Nach der Volumenhypothese ist die Orientierung des Substrats konserviert, die Fettsäure gelangt auch hier mit dem Methylende in die Bindungstasche. Für die 5-Lipoxygenierung entscheidend ist demnach das im Vergleich zu 12- und 15-LOXn noch größere Volumen der Tasche. Im Folgenden wurden beide Theorien überprüft und getestet, ob und wann es zu einer inversen Substratorientierung kommt.

3.2.1.1 *Die Positionsdeterminanten der Fettsäureoxygenierung bleiben bei der (His)₆-15-LOX erhalten*

Die ortsgerichtete Mutagenese der Positionsdeterminanten der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX in die kleineren Aminosäuren (F353L, I418A, I593A) führt auch bei der (His)₆-15-LOX zu der erwarteten Verschiebung zur 12-Lipoxygenierung durch Vergrößerung der Substratbindungstasche (Abb. 16). Die Verhältnisse der 12/15-Lipoxygenierung entsprechen etwa denen der WT-Mutanten. Die Positionsdeterminanten bleiben also auch bei diesem rekombinanten Enzym erhalten.

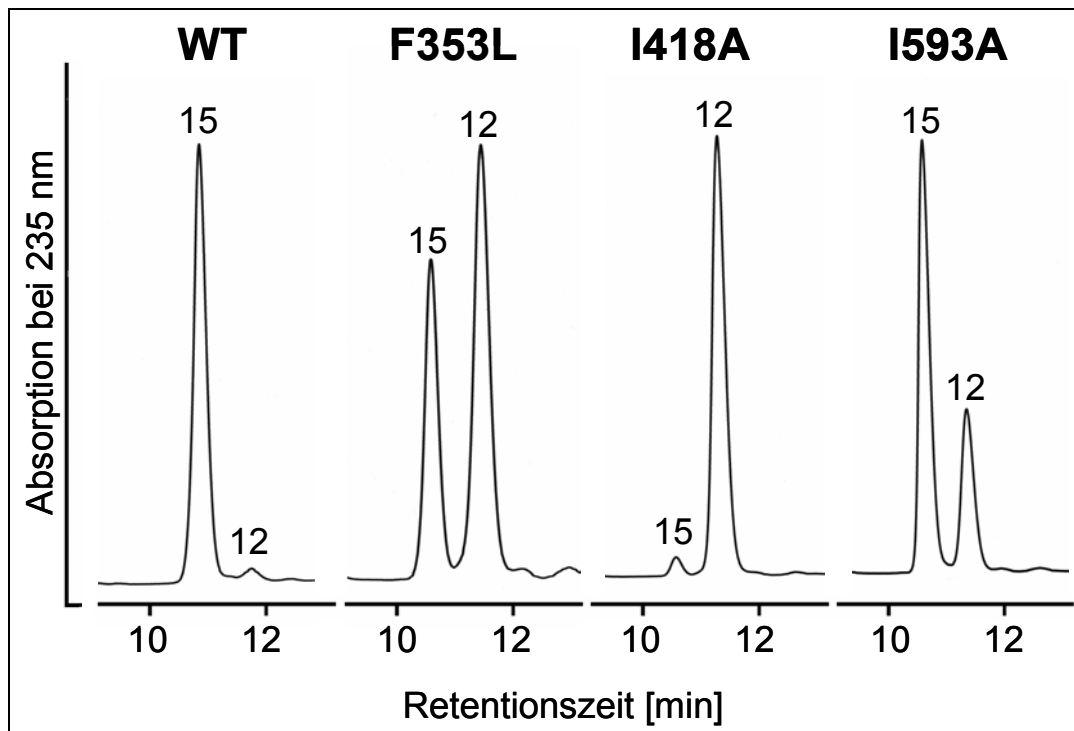


Abb. 16: Positionsspezifität der (His)₆-15-LOX-Mutanten. Dargestellt sind Ausschnitte der RP-HPLC-Chromatogramme. Die Produkte des Arachidonsäureumsatzes entsprechen denen der Wildtyp-Mutanten.

3.2.1.2 Modifizierung des Substrats führt zu einer veränderten Positionsspezifität

Die zweite Möglichkeit neben Veränderungen am Enzym (Mutagenese) die Positionsspezifität zu beeinflussen, besteht in der Modifizierung des Substrats. Die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX ist ein Enzym mit dualer Positionsspezifität, d.h. neben der 15-Lipoxygenierung (Wasserstoffabstraktion am C-13) als Hauptreaktion erfolgt zum geringen Teil auch 12-Lipoxygenierung (Wasserstoffabstraktion am C-10). Die Arachidonsäure ist bei diesem Enzym also so positioniert, dass zwei verschiedene Wasserstoffdonoren (bisallylständige Methylene) in der Nähe des Akzeptors des Enzyms (Nichthämeisen) lokalisiert sind. Um diese Anlagerung zu beeinflussen, wurde die Substratfettsäure auf drei verschiedene Arten modifiziert (Tab. 3):

I. Einführung großer Gruppen am Methylen der Fettsäure

Von der Einführung sterisch anspruchsvoller Gruppen wie tert.-Butyl ($-(\text{CH}_3)_3$) oder Iod wurde angenommen, dass dadurch C-10 als Wasserstoffdonor aus der Umgebung des Eisens verdrängt wird, da das Substrat, bei Bindung mit der Methylgruppe in der Enzymtasche, weniger tief in die Bindungstasche eintauchen kann. Folglich sollte der kleine Anteil an 12-Lipoxygenierung noch weiter verringert sein.

II. Austausch der ω -terminalen Methylgruppe gegen eine Hydroxygruppe

Diese Hydroxy-Fettsäure sollte ein schlechteres Substrat darstellen als Arachidonsäure, da eine polare Gruppe in die hydrophobe Bindungstasche eindringen muss. Dies müsste sich vor allem auf die Substrataffinität auswirken. Darüber hinaus ist möglicherweise eine inverse Substratorientierung erleichtert.

III. Methylierung der Carboxylgruppe

Um eine inverse Substratorientierung zu ermöglichen, müsste vermutlich die Energie-Barriere, die mit dem Eintauchen polarer Gruppen in das hydrophobe Milieu der Substratbindungstasche einhergeht, gesenkt werden. Hierzu wurde die Ladung der Fettsäure-Carboxylgruppe durch Veresterung eliminiert.

Tab. 3: Strukturen der untersuchten synthetischen Substrate. ASR=Arachidonsäure-Rest, der in allen Substraten identische Teil von der Carboxylgruppe bis zum C-18 der Fettsäuren. Für die Berechnung der Abstände wurde das am weitesten entfernte Atom am ω -Terminus verwendet.

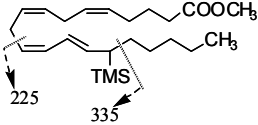
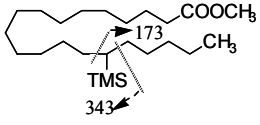
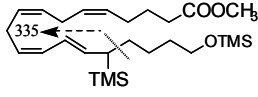
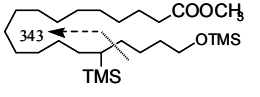
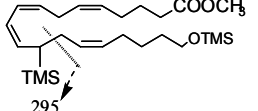
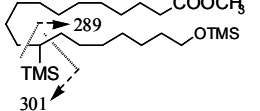
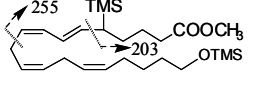
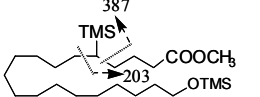
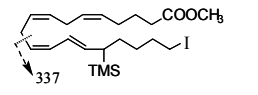
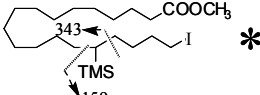
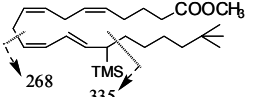
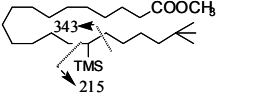
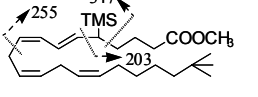
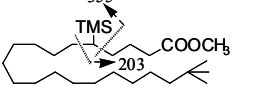
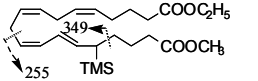
Substrat	Struktur	Abstand vom Methyl-Terminus (Å)	
		C-13	C-10
18-CH ₂ -CH ₃ - C20: Δ 5,8,11,14 (ASR-CH ₂ -CH ₃)		8.63	9.55
18-CH ₂ -I- C19: Δ 5,8,11,14 (ASR-CH ₂ -I)		9.21	10.26
18-CH ₂ -C-(CH ₃) ₃ - C23: Δ 5,8,11,14 (ASR-CH ₂ -C-(CH ₃) ₃)		9.93	10.79
18-CH ₂ -OH C19: Δ 5,8,11,14 (ASR-CH ₂ -OH)		8.42	9.37
18-CH ₂ -CH ₂ -OH- C20: Δ 8,11,14 (ASR'-CH ₂ -CH ₂ -OH)		9.64	10.46
18-COOH- C19: Δ 5,8,11,14 (ASR-COOH)		8.46	9.74

Für eine übersichtliche Benennung der Arachidonsäurederivate wird die Bezeichnung Arachidonsäurerest (ASR) für den bei allen Substraten identischen Teil von der Carboxylgruppe bis zum C-18 der Fettsäure eingeführt.

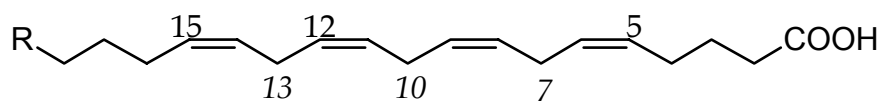
Bei der Umsetzung von Arachidonsäure ($\text{ASR-CH}_2\text{-CH}_3$) und der beiden Derivate $\text{ASR-CH}_2\text{-I}$ (die ω -Methylgruppe wurde gegen Iod ausgetauscht) und $\text{ASR-CH}_2\text{-C-(CH}_3)_3$ (die ω -Methylgruppe wurde durch eine tert.-Butyl-Gruppe ersetzt) mit der WT-LOX entstand jeweils ein konjugiertes Dien als Hauptprodukt, welches über RP-HPLC und SP-HPLC gereinigt wurde. Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) ergab, dass es sich jeweils um das 15-Hydro(per)oxy-Produkt handelte (Tab. 4). Mit diesen beiden Arachidonsäurederivaten als Substrat konnten keine enzymatischen 12-Lipoxygenierungsprodukte nachgewiesen werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Ort der Wasserstoffabstraktion für 12-Lipoxygenierung, das C-10, zu weit vom Eisen entfernt ist. Dies würde mit einer Substratbindung mit dem Methylenende in der Enzymtasche übereinstimmen, da der Abstand von C-10 zum ω -Ende dieser beiden Substrate größer ist als bei Arachidonsäure (Tab. 3). Stattdessen wurde bei der Umsetzung von $\text{ASR-CH}_2\text{-C-(CH}_3)_3$ zu einem Anteil von 10% das 5-Lipoxygenierungsprodukt gefunden. Dies spricht dafür, dass die Größe der tert.-Butyl-Gruppe zum geringen Teil eine inverse Substratorientierung erzwingt.

Der Austausch der ω -Methylgruppe gegen eine Hydroxygruppe ($\text{ASR-CH}_2\text{-OH}$) führte zu einer starken Änderung in der Positionsspezifität: Die Reaktion führte hauptsächlich zum 12-Lipoxygenierungsprodukt (Tab. 5 und Abb. 17 unten). Da hier die Distanz des C-10 zum ω -Ende nur wenig kürzer als bei Arachidonsäure ist (Tab. 3), wurde nur eine leichte Verschiebung zur 12-Lipoxygenierung erwartet. Die starke Änderung zeigt, dass auch andere Faktoren, wie die Polarität des ω -Endes der Substratfettsäure, die Substratbindung beeinflussen können. Da keine 5-Lipoxygenierungsprodukte gefunden wurden, scheint die Einführung einer polaren Gruppe am ω -Ende der Arachidonsäure nicht ausreichend zu sein, um eine inverse Substratorientierung zu erzwingen. Die Umsetzung der C-20 ω -OH-Fettsäure ($\text{ASR}'\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), in der die C5=C6 Doppelbindung fehlt, führte ausschließlich zum 15-Lipoxygenierungsprodukt (Tab. 5). Da bei diesem Substrat der Abstand des C-10 vom ω -Ende durch eine zusätzliche CH_2 -Gruppe größer ist als bei Arachidonsäure, wurde dieses Ergebnis auch erwartet.

Tab. 4: Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Daten der LOX-Produkte aus dem Umsatz von Arachidonsäurederivaten. Hydroxygruppen wurden silyliert und Carboxylgruppen verestert. Die Nummerierung der C-Atome erfolgte jeweils wie für die freie Säure. Weitere Messungen erfolgten nach Hydrierung der Doppelbindungen. In Klammern: relative Häufigkeit des Ions in %. *: CH₂-I wurde bei der Hydrierung zu CH₃ reduziert. **: Die freie Carboxylgruppe wurde zu Unterscheidungszwecken mit Diazoethan ethyliert.

Substrat-Rest	Produkt	aussagekräftige Ionen (m/z)	
		nativ	hydriert
-CH ₃	15-OH	225 (81), 335 (11) 	173 (72), 343 (23) 
-OH	15-OH	480 (12 [M ⁺]), 335 (20) 	473 (5 [M ⁺ -15]), 343 (100) 
-OH	12-OH	295 (100) 	301 (100), 289 (65), 473 (7 [M ⁺ -15]) 
-OH	5-OH	480 (3.5 [M ⁺]), 203 (60), 255 (14) 	203 (100), 387 (10), 473 (30 [M ⁺ -15]) 
-I	15-OH	518 (4 [M ⁺]), 337 (100) 	382 (1 [M ⁺ -15]), 343 (25), 159 (100) 
-C(CH ₃) ₃	15-OH	448 (16 [M ⁺]), 268 (75), 335 (8) 	441 (1 [M ⁺ -15]), 215 (100), 343 (40) 
-C(CH ₃) ₃	5-OH	448 (16 [M ⁺]), 203 (56), 255 (60), 347 (24) 	441 (1, [M ⁺ -15]), 203 (100), 355 (40) 
-C(=O)CH ₃	15-OH	450 (15 [M ⁺]), 255 (50), 349 (25) 	

Tab. 5: Oxidation von Arachidonsäure-Derivaten verändert am Methylterminus durch die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX. Dargestellt sind die kinetischen Konstanten und die Anteile der Oxygenierungsprodukte. *: Zusätzlich zum 15-OH-Produkt wurden etwa 10% 5-Lipoxygenierung beobachtet.



Rest R	K _M -Wert (μM)	V _{max} (s ⁻¹)	Oxygenierungs- verhältnis (C ₁₅ / C ₁₂)
-CH ₂ -CH ₃	6.5	22.8	93/7
-CH ₂ -I	43	22.5	99/1
-CH ₂ -C(CH ₃) ₃	41	3.1	99/1*
-CH ₂ -OH	153	3.7	21/79
-COOH	n. d.	<0.1	n. d.

Die kinetischen Konstanten in Tab. 5 belegen, dass Arachidonsäure bei weitem das Beste der getesteten Substrate ist. Die hohen K_M- und niedrigeren V_{max}-Werte der anderen Substrate zeigen, dass die Einführung von sterisch anspruchsvollen oder polaren Gruppen am ω-Ende der Fettsäure eine optimale Substratbindung zu verhindern scheinen. Insbesondere der hohe K_M-Wert für die ω-Hydroxy-Fettsäure spiegelt die energetische Barriere wider, die mit dem Eintauchen einer polaren Gruppe in die hydrophobe Bindungstasche einhergeht. Auf die gleichen energetischen Gründe zurückzuführen sein dürfte die Tatsache, dass die Dicarbonsäure nicht oxygeniert wurde.

3.2.1.3 Inverse Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX erfolgt nach simultaner Modifikation des Carboxyl- und des Methylterminus

Die Methylierung der Carboxylgruppe der Arachidonsäure allein führte zu keiner nennenswerten Veränderung der Produktzusammensetzung: 15-H(P)ETE bleibt das Hauptprodukt (Tab. 6). Allerdings ist der Methylester ein deutlich schlechteres Substrat, wie die

kinetischen Konstanten belegen (Tab. 6). Die Bindungsaffinität ist um eine Größenordnung geringer und V_{\max} nur etwa halb so hoch wie für die freie Arachidonsäure.

Im Gegensatz dazu führte die Methylierung der ω -Hydroxy-Fettsäure ASR-CH₂-OH zu einer drastischen Änderung der Produktzusammensetzung: Neben dem 12-OH-Produkt (33%) wurde als Hauptreaktion 5-Lipoxygenierung beobachtet (Abb. 17, Tab. 6).

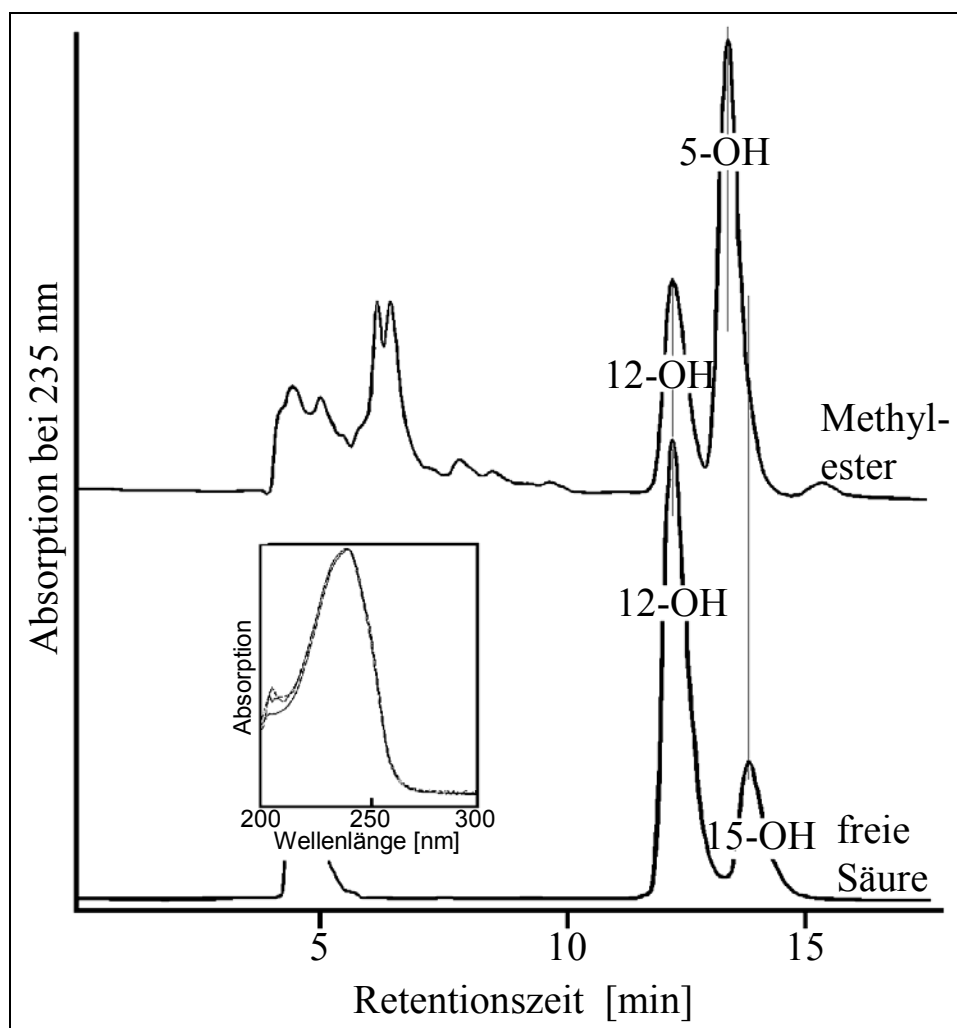
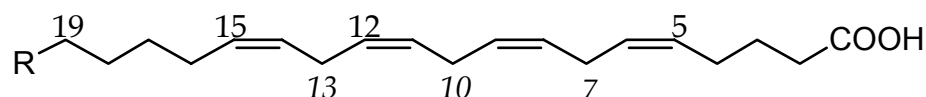


Abb. 17: Oxygenierungsprodukte des Umsatzes der ω -Hydroxy-Fettsäure ASR-CH₂-OH und des Methylesters mit der 15-LOX. Vor Durchführung der HPLC wurden die Produkte der freien Säure methyliert. Insert: Die Absorptionsspektren der beiden Hauptprodukte sind sehr ähnlich und deuten auf ein konjugiertes Dien hin.

Darüber hinaus sind die Bindungsaffinität des Methylesters und V_{\max} um ein Mehrfaches höher als bei der freien Säure. Es ist also davon auszugehen, dass die Energiebarriere beim Eintauchen des Methylesters in die hydrophobe Bindungstasche geringer ist als die für die Hydroxygruppe. Dadurch scheint eine inverse Substratbindung und damit 5-Lipoxygenierung favorisiert zu sein.

Bei der Umsetzung des Methylesters der C-20-Hydroxy-Fettsäure ohne die C5=C6-Doppelbindung trat keine 5-Lipoxygenierung auf. Da diesem Substrat das bisallylständige C-7 fehlt, war dies zu erwarten. Die Produktzusammensetzung entspricht also der der freien Säure (Tab. 6).

Tab. 6: Auswirkungen der Carboxylgruppen-Veresterung auf die Oxygenierungsverhältnisse von Arachidonsäurederivaten durch die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX. Für die Berechnung der relativen K_M - und V_{max} -Werte wurden die für Arachidonsäure ermittelten ($6,5 \mu\text{M}$ bzw. $22,8 \text{ s}^{-1}$) auf 1 bzw. auf 100 gesetzt. *: Keine C5=C6 Doppelbindung.



R	Freie Säure		Methylester		Oxygenierung am C-Atom	
	rel. K_M	rel. V_{max}	rel. K_M	rel. V_{max}	Freie Säure	Methylester
-CH ₃	1	100	9.2	52.5	15 (95%) 12 (5%)	15 (90%) 12 (10%)
-OH	23.5	16.2	4.2	55.0	15 (20%) 12 (80%)	12 (33%) 5 (67%)
-CH ₂ OH*	28.2	30.6	21.2	25.5	15 (98%)	15 (98%)
-C(CH ₃) ₃	6.3	13.4	8.7	23.6	15 (93%) 5 (7%)	5 (>98%)

Eine noch größere Änderung der Positionsspezifität wurde bei der Oxygenierung des Methylesters von ASR-CH₂-C-(CH₃)₃ beobachtet (Abb. 18, Tab. 6). Kam es bei der freien Säure bereits zu etwa 10% zur 5-Lipoxygenierung, so wird mit dem Methylester fast ausschließlich (> 98%) das 5-OH-Produkt gebildet. Untersuchungen der beiden Hauptprodukte aus der Umsetzung der freien Säure und des Methylesters (15- und 5-Lipoxygenierung) mit CP-HPLC ergaben jeweils nur einen Peak, was auf eine hohe Chiralität und damit ein enzymatisches Produkt hinweist. Diese 5-Lipoxygenierung lässt sich am besten durch eine inverse Bindung des Substrats in der Enzymtasche erklären. Vermutlich ist dies auf die Reduzierung der Polarität der Carboxylgruppe durch Veresterung und auf den sterischen Anspruch der tert.-Butyl-Gruppe am ω-Terminus zurückzuführen. Für eine inverse Substratbindung bei der 15-LOX und damit verbundener 5-Lipoxygenierung müssen also beide Enden der Substratfettsäure modifiziert werden.

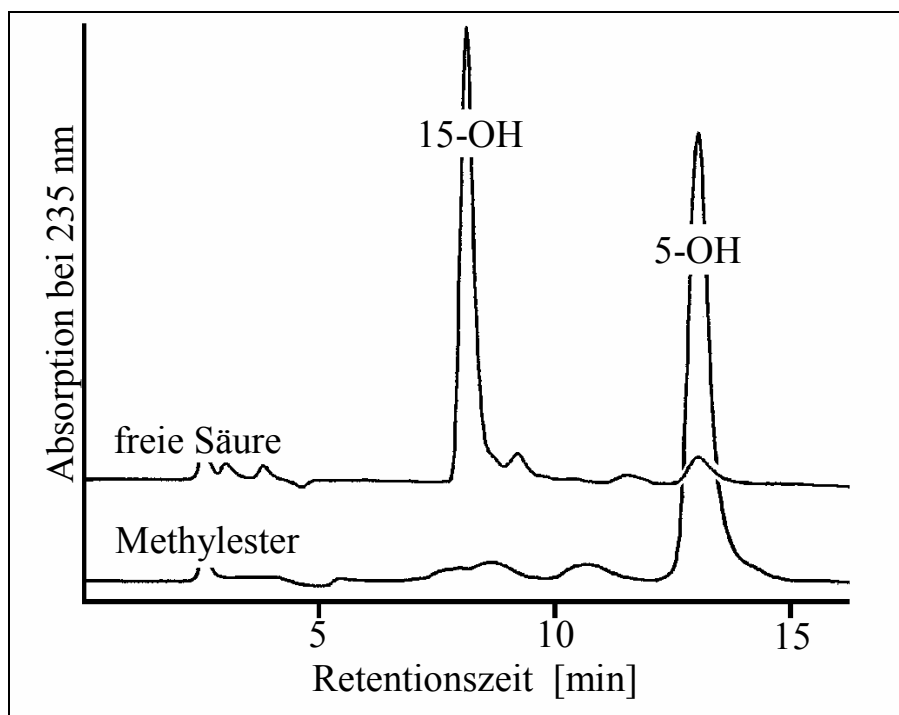


Abb. 18: Oxygenierungsprodukte des Umsatzes von $\text{ASR-CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ (oben) und des Methylesters (unten) mit der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX. Produkte der freien Säure wurden vor der HPLC-Analyse methyliert.

3.2.1.4 Untersuchungen mit Positionsspezifität verändernden Enzymmutanten bestätigen die inverse Substratbindung

Zur Bestätigung der möglichen inversen Bindung von synthetischen Fettsäuresubstraten bei der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX wurden Versuche mit Positionsspezifität verändernden Enzymmutanten durchgeführt. Nach dem Modell ermöglicht die Verkleinerung der am Boden der Substratbindungstasche liegenden Aminosäure Ile418 (Mutation zu Ala) ein tieferes Eintauchen der Arachidonsäure, wodurch eine Verschiebung von 15- zu 12-Lipoxygenierung stattfindet. Bei einer inversen Substratbindung sollte analog eine Verschiebung von 5- zu 8-Lipoxygenierung zu beobachten sein.

Die Umsetzung von Arachidonsäure mit der I418A-Mutante ergab eine Verschiebung der Produktzusammensetzung von hauptsächlich 15- zu hauptsächlich 12-Lipoxygenierung (WT: 12/15=4/96, I418A: 12/15=89/11, Abb. 16). Bei der Umsetzung der freien Säure des Substrats mit der tert.-Butyl-Gruppe am ω -Terminus ($\text{ASR-CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$) durch die I418A-Mutante wurde hauptsächlich das 15-OH-Produkt gefunden (42%), das 12-OH-Produkt machte nur etwa 20% des Produktgemisches aus (Tab. 7). Dies lässt sich dadurch begründen, dass die Vertiefung der Substratbindungstasche durch die Mutation zum Teil

durch den großen tert.-Butyl-Rest des Substrats kompensiert wurde. Diese Fettsäure gelangt demnach nicht tief genug mit dem Methylen in die Bindungstasche hinein um C-13 (Ort der Wasserstoffabstraktion für 15-Lipoxygenierung) komplett aus der Eisenumgebung zu entfernen. Zusätzlich zu diesen beiden Produkten fand verstärkt 5-Lipoxygenierung statt (36%), was wiederum auf eine inverse Substratbindung zurückgeführt wird.

Bei der Reaktion der I418A-Mutante mit dem Methylester von ASR-CH₂-C-(CH₃)₃ traten im Gegensatz zum WT zwei Produkte auf. Als Hauptprodukt wurde das 5-OH-Derivat gefunden (60%), welches das einzige Produkt des Umsatzes mit dem WT darstellte. Darüber hinaus gab es aber auch zu 40% ein weiteres Produkt, welches durch Elektrospray-MS als 8-OH-Derivat identifiziert wurde (Abb. 19).

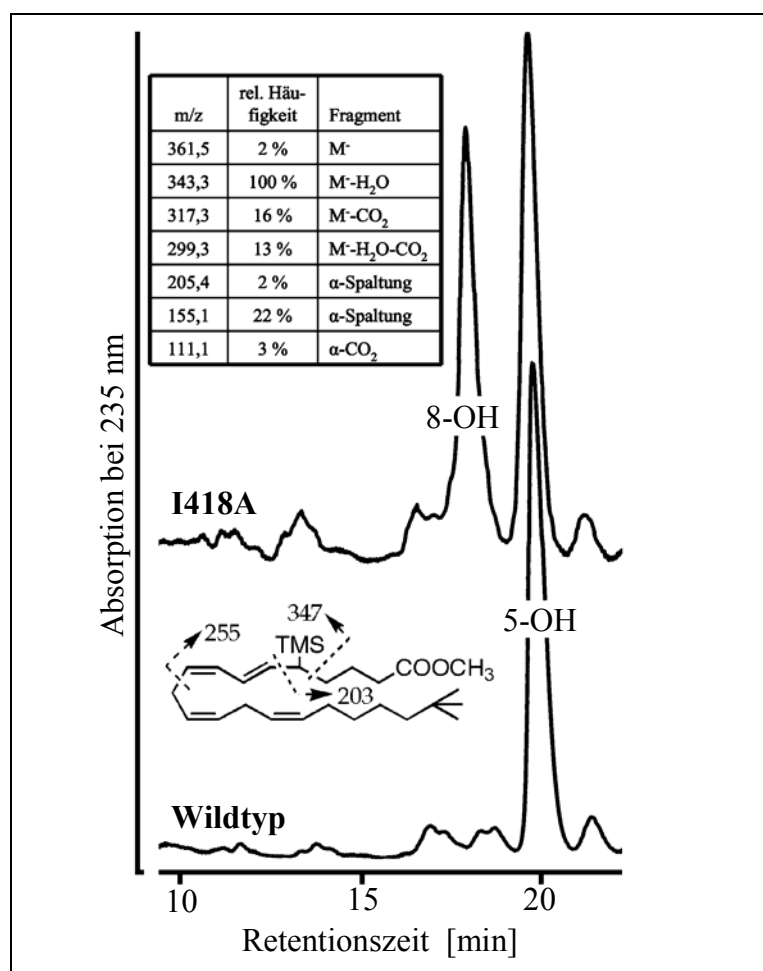
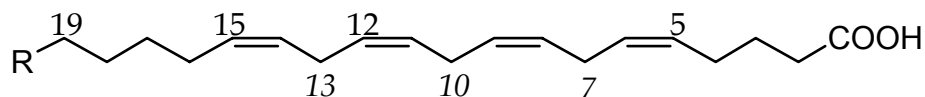


Abb. 19: Produkte der Umsetzung des Methylesters von ASR-CH₂-C-(CH₃)₃ durch den Wildtyp und die I418A-Mutante. Unteres Insert: Fragmentierungsmuster und Schlüsselionen des Hauptproduktes der Wildtyp-Reaktion aus GC/MS. Oberes Insert: Analyse des zweiten Produktes aus der Umsetzung mit I418A mittels Elektrospray MS. Die beobachteten Ionen bestätigen das 8-OH-Produkt.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die Hydroxy-Fettsäure ASR-CH₂-OH und deren Methylester. Während der Umsatz der freien Säure mit der I418A-Mutante wiederum das

12-OH-Derivat als Hauptprodukt ergab (85%), war mit dem Methylester 8-Lipoxygenierung die Hauptreaktion (67%) (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung der Produkte aus der Umsetzung von Arachidonsäurederivaten mit der WT-LOX und der I418A-Mutante.



R	Oxygenierung am C-Atom	Wild-Typ (%)		I418A (%)	
		Freie Säure	Methylester	Freie Säure	Methylester
-C(CH ₃) ₃	15	84	0	42	0
	12	0	0	22	0
	8	0	0	0	40
	5	16	100	36	60
-OH	15	27	0	15	0
	12	73	31	85	11
	8	0	0	0	67
	5	0	69	0	22

Analoge Ergebnisse mit weniger signifikanten Änderungen ergaben sich aus gleichen Versuchen mit den ebenfalls positionsbestimmenden Mutanten F353L und I593A (ohne Abbildung). Auch hier wurde mit den beiden veresterten Substraten ein deutlicher Anteil des 8-OH-Produktes gefunden.

Die Vertiefung der Bindungstasche durch die Mutation I418A konnte also durch Einführung einer sterisch anspruchsvollen Gruppe (tert.-Butyl) am Methylende des Substrats kompensiert werden. Dies deutet darauf hin, dass freie Säuren mit dem Methylterminus in der Bindungstasche gebunden werden. Bei den getesteten Methylestern führte die Vergrößerung der Substratbindungstasche zu einer Verschiebung von 5- zu 8-Lipoxygenierung was einem tieferen Eintauchen des Methylesters in die Bindungstasche entspricht. Damit wurde die inverse Bindung dieser Substrate bei der 15-LOX bestätigt (Abb. 20).

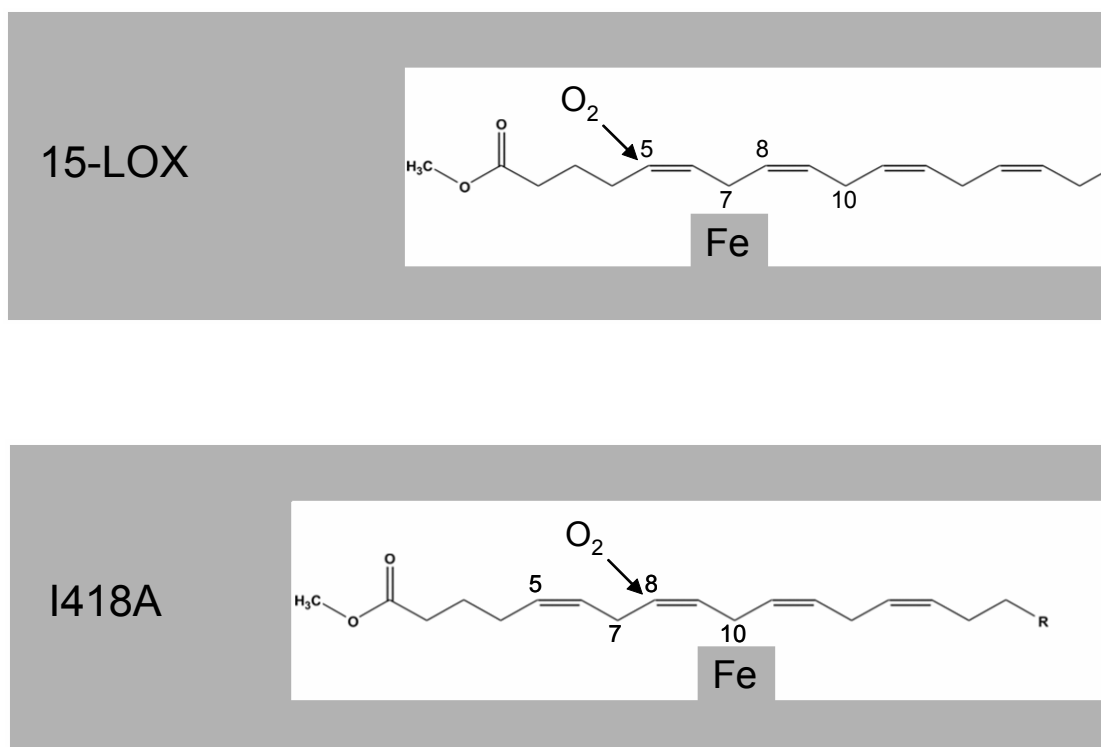


Abb. 20: Modelle der inversen Substratbindung bei der 15-LOX und der I418A-Mutante. Inverse Substratbindung tritt auf bei veresteter Carboxylgruppe und gleichzeitigem Vorhandensein großer oder polarer Reste am Methylterminus (R). Bei Vergrößerung der Bindungstasche durch Mutation von Ile418 zu dem kleineren Ala gelangt die Fettsäure tiefer hinein, so dass Wasserstoffabstraktion am C-10 statt am C-7 erfolgen kann. Daraus folgt statt 5-Lipoxygenierung die Bildung des 8-Lipoxygenierungsproduktes.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich aber noch keine Aussage über die Substratbindung bei 5-LOXn ableiten. Die Frage der Substratbindung bei diesen Enzymen wird im Folgenden untersucht.

3.2.1.5 Bei der humanen 5-LOX ist keine inverse Substratbindung möglich

Vor kurzem wurde berichtet, dass die humane 5-LOX durch Mutation der Positions determinanten in größere Aminosäuren (F359W,A424I,N425M,A603I) in ein 15-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden kann (Schwarz et al., 2001). Dies würde die Volumenhypothese unterstützen, nach der auch bei der 5-LOX die Größe der Substratbindungstasche für die Positionsspezifität entscheidend ist. Für die folgenden Versuche wurden die humane 5-LOX sowie die vierfach Mutante F359W,A424I,N425M,A603I in *E. coli* exprimiert und über ATP-Sepharose aufgereinigt. In Abb. 21 ist die Produktverteilung des Umsatzes von Arachidonsäure mit den beiden Enzymspezies dargestellt.

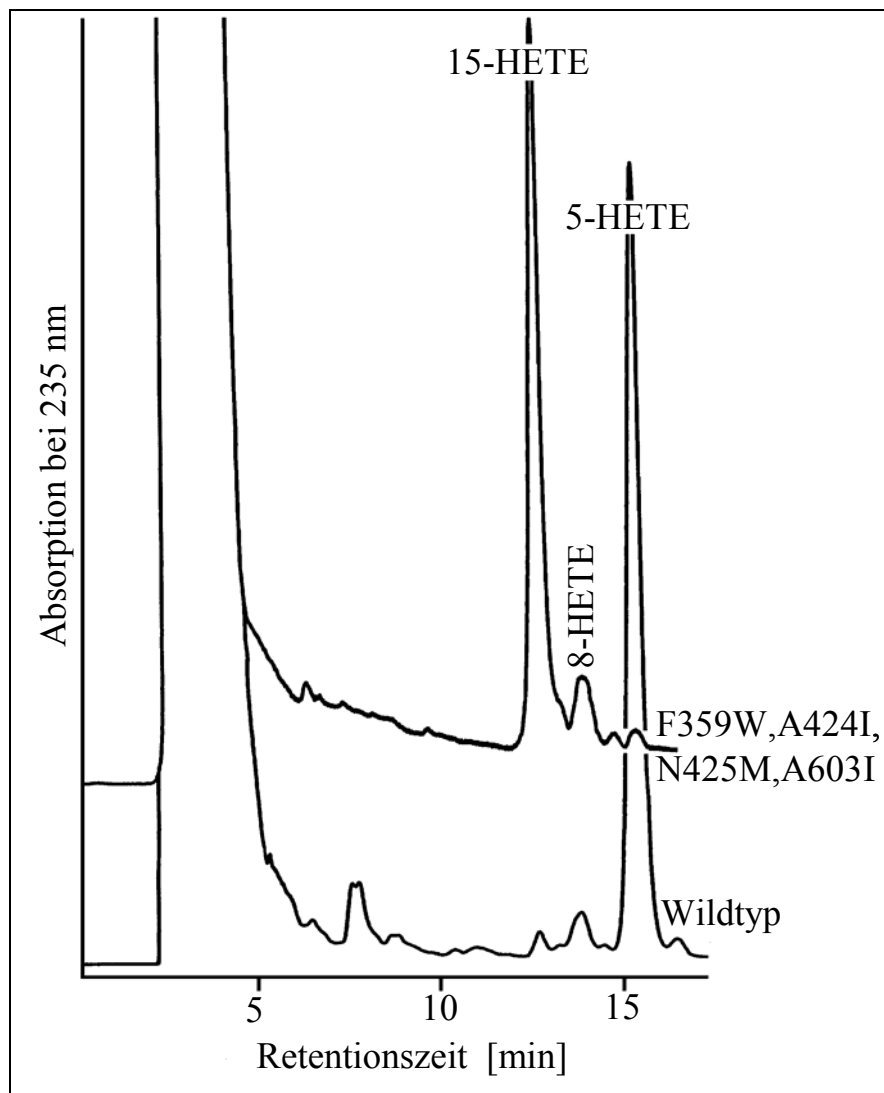


Abb. 21: HPLC-Chromatogramme der Produkte aus der Umsetzung von Arachidonsäure mit der rekombinanten humanen 5-LOX und deren vierfach Mutante F359W,A424I,N425M,A603I.

Für eine genauere Untersuchung der Substratbindungsverhältnisse wurden zunächst verschiedene natürliche Fettsäuren auf ihre Oxidierbarkeit untersucht (Tab. 8).

Wie sich zeigte, akzeptiert die humane 5-LOX nur Fettsäuren der Kettenlänge C-20 mit zumindest C5=C6 und C8=C9 Doppelbindungen (Wasserstoffabstraktion am doppelallylständigen C7). Im Gegensatz dazu oxygeniert die vierfach Mutante Fettsäuren der Kettenlängen C-18 und C-20, die zumindest die Doppelbindungen C11=C12 und C14=C15 enthalten (Wasserstoffabstraktion am doppelallylständigen C13). Auch diese Ergebnisse deuten auf einen entscheidenden Einfluss des Abstands des doppelallylständigen Methylens vom ω -Terminus der Fettsäure hin und unterstützen somit das Modell der Substratanlagerung mit dem ω -Terminus in der Bindungstasche (Volumenhypothese).

Tab. 8: Oxygenierung verschiedener Fettsäuren durch die rekombinante humane 5-LOX und deren vierfach-Mutante F359W,A424I,N425M,A603I. Die jeweilige Oxygenierungsgeschwindigkeit von Arachidonsäure (C20:Δ5,8,11,14) wurde 100% gesetzt.

Substrat	5-LOX	F359W+A424I+N425M+A603I
C20:Δ5,8,11,14	100	100
C20:Δ5,8,11	132	0
C20:Δ11,14,17	0	90
C20:Δ11,14	0	106
C18:Δ9,12	3	142
C18:Δ6,9,12	0	144
C18:Δ9,12,15	0	576

Um zu überprüfen, ob die inverse Bindung einer Fettsäure mit der Carboxylgruppe in der Bindungstasche der 5-LOX überhaupt möglich ist, wurde die Dicarbonsäure ASR-COOH (Tab. 3) als Substrat angeboten. Diese Dicarbonsäure ist ein symmetrisches Molekül und der Abstand des bisallylständigen Methylens C-7 von beiden Carboxylgruppen sollte für eine 5-Lipoxygenierung optimal sein. Bei möglicher inverser Bindung müsste dieses Substrat also schnell umgesetzt werden. Dies war aber weder für den Wildtyp noch für die vierfach-Mutante der Fall, beide Enzyme oxygenierten, wie auch schon die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX, dieses Substrat nicht.

Um mögliche Energiebarrieren, die mit dem Eintauchen der Carboxylgruppe in die Bindungstasche der LOX einhergehen, zu senken, wurde die Dicarbonsäure monomethyliert und der 5-LOX sowie der WT-15-LOX als Substrat angeboten. Wie sich zeigte, wurde der Monomethylester von beiden Enzymen schnell umgesetzt (Abb. 22, Insert). Aus der RP-HPLC wurde jeweils ein einzelnes Oxygenierungsprodukt ermittelt, dessen Untersuchung durch MS ergab, dass die Oxygenierung in der Nähe des Monomethylesters stattfand (Tab. 4 und Tab. 9). Bei Nummerierung der C-Atome mit der freien Carboxylgruppe als C1 war das Hauptprodukt der 5-LOX-katalysierten Lipoxygenierung das 5-OH-Derivat,

während die WT-15-LOX das 15-OH Produkt bildete (Abb. 22). Daraus folgt, dass sich bei der Umsetzung dieses Substrats jeweils die methylierte Carboxylgruppe in der Substratbindungstasche befand.

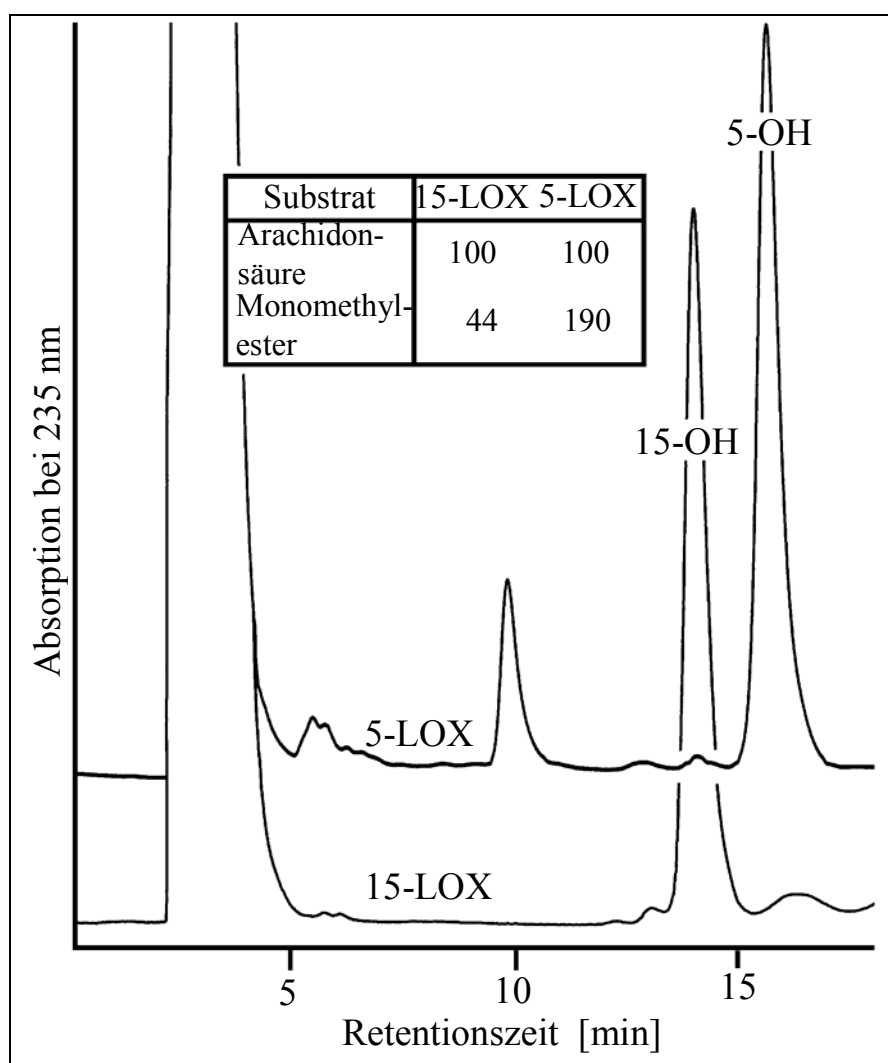


Abb. 22: HPLC-Chromatogramm der Umsetzung des Dicarbonsäure-Monomethylesters ASR-COOMe mit der rekombinanten humanen 5-LOX und der rekombinanten WT-15-LOX. Insert: Oxygenierungsgeschwindigkeiten des Substrats im Vergleich zu Arachidonsäure.

Tab. 9: Negative-Ionen-Massenspektrometrie-Daten der beiden Hauptprodukte aus der Umsetzung des Dicarbonsäure-Monomethylesters ASR-COOMe mit humaner 5-LOX und der WT-15-LOX nach Elektrospray-Ionisation. In Klammern: Relative Häufigkeit des Ions.

	M^- m/z	$M^- - H_2O$ m/z	$M^- - MeOH$ m/z	α -Spaltung m/z
5-LOX-Produkt	349,4 (3%)	330,9 (82%)	317,1 (100%)	114,7 (16%)
15-LOX-Produkt	349,7 (2%)		317,0 (100%)	218,7 (3%)

Diese Ergebnisse stimmen mit der Annahme überein, dass bei beiden Enzymen, 5-LOX und 15-LOX, aus energetischen Gründen der Methylester in die hydrophobe Bindungstasche gelangt und nicht die polarere Carboxylgruppe. Die Veresterung der Säuregruppe senkt deren Polarität also ausreichend, um ein Eindringen in die Bindungstasche zu ermöglichen. Analog kann geschlossen werden, dass die Verhältnisse für die freie Arachidonsäure identisch sind, d. h. das Methylende der Arachidonsäure gelangt auch bei der 5-LOX in die Bindungstasche.

Im Gegensatz zu der 15-LOX akzeptiert die 5-LOX jedoch keine Methylester von Monocarbonsäuren als Substrat. So wurde z. B. der Arachidonsäure-Methylester durch die 5-LOX nicht umgesetzt. Daraus kann abgeleitet werden, dass die freie Carboxylgruppe des Substrats bei der 5-LOX einen größeren Einfluss auf die Substratanlagerung hat als bei der 15-LOX.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Fettsäuren normalerweise mit dem Methylterminus in der Substratbindungstasche der 12/15-LOXn gebunden werden. Eine inverse Substratbindung kann jedoch bei diesen Enzymen durch gleichzeitige Modifikation beider Enden der Fettsäure (Methylierung der Carboxylgruppe, sterisch anspruchsvolles oder polares Methylende) erzwungen werden. Bei der 5-LOX war keine inverse Substratbindung nachweisbar. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Fettsäuren auch bei der 5-LOX mit dem Methylende in der Substratbindungstasche gebunden werden (konservierte Substratorientierung). Somit wurde die Volumenhypothese, nach der das Volumen der Bindungstasche auch bei der 5-LOX für die Positionsspezifität verantwortlich ist, bestätigt.

3.2.2 Enzym-Hemmstoff-Wechselwirkungen

Neben den Substraten sollte das aktive Zentrum der LOX auch für Hemmstoffe zugänglich sein. Ein solcher Hemmstoff kann die Substratbindungstasche blockieren und/oder das katalytisch aktive Eisen komplexieren. In beiden Fällen könnte keine LOX-Reaktion mehr stattfinden. Aufgrund des pharmakologischen Interesses und der äußerst starken inhibitorischen Wirkung von Ebselen (Abb. 9) wurde dessen Hemmmechanismus näher untersucht.

3.2.2.1 Die katalytisch inaktive Eisen[II]-LOX wird durch Ebselen irreversibel gehemmt

Man unterscheidet bei LOXn den katalytisch inaktiven Grundzustand, bei dem das Nicht-hämeisen in seiner reduzierten Form vorliegt (Fe[II]-LOX), und den katalytisch aktiven Zustand, der dreiwertiges Eisen enthält (Fe[III]-LOX). Nach Inkubation der Fe[II]-LOX mit Ebselen für 30 s bei Raumtemperatur und anschließender Messung der Enzymaktivität ergibt sich für die Hemmung ein IC_{50} -Wert von 65 nM (LOX-Konzentration 32 nM). Dieser Wert ist deutlich geringer als der anderer in der Literatur häufig verwendeter LOX-Inhibitoren (Tab. 10), was die äußerst starke Hemmwirkung des Ebselens unterstreicht.

Tab. 10: Übersicht der Hemmwirkungen verschiedener gängiger LOX-Inhibitoren. Die 15-LOX (29 nM) und die jeweiligen Inhibitoren wurden in 1 ml Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) für 30 s vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine spektrometrische Messung der Enzymaktivität mit 260 μ M Linolsäure als Substrat. Die Zahlen entsprechen dem Mittelwert von mindestens zwei Messungen. *Der IC_{50} -Wert wurde übernommen aus (Schewe et al., 1986).

Inhibitor	Inhibierung [%]		IC_{50} -Wert [μ M]
	50 nM	500 nM	
Ebselen	16	90	0,06
PD 146 176	12	59	0,38
Eicosatetrainsäure	7	73	0,12*
Nordihydroguaiarsäure	9	56	0,5*
4-Nitrocatechol	0	54	4,6*
tert.-Butylhydroxyanisol	4	2	160*
Salicylhydroxamsäure	6	6	57*

Genauere Untersuchungen ergaben, dass die Hemmung der Fe[II]-LOX durch Ebselen unmittelbar auftritt und nicht von der Dauer der Vorinkubation abhängt (kürzeste gemessene Vorinkubationszeit: 5 s). Darüber hinaus ist sie irreversibel, da Gelfiltration, Dialyse und der Zusatz eines Überschusses an Substrat die Enzymaktivität nicht wieder herstellen konnten (ohne Abbildung). Dies stimmt mit dem aus einem Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelten Hemmmechanismus überein. Der Schnittpunkt der extrapolierten Geraden auf der Abszisse deutet auf eine nicht-kompetitive Hemmung hin (Abb. 23).

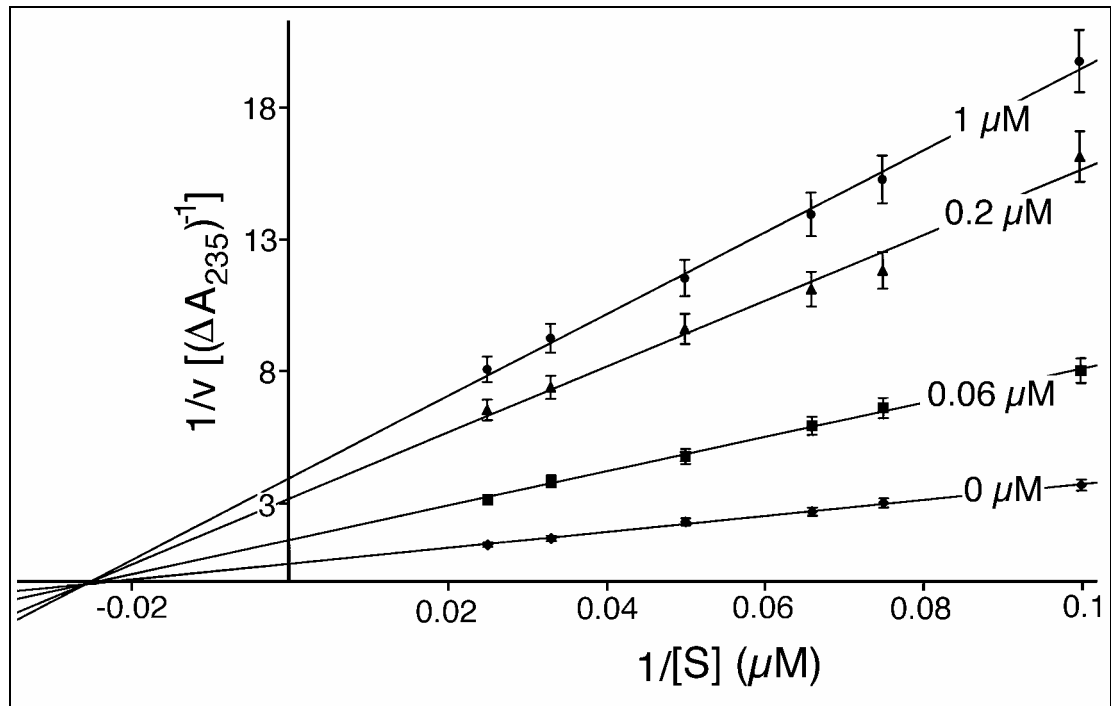


Abb. 23: Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der Fe[II]-LOX durch Ebselen nach Vorinkubation. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Messungen. Die Ebselen-Konzentration betrug 0-1 μM . Der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden auf der Abszisse deutet auf eine nicht-kompetitive Hemmung hin.

Die ermittelten kinetischen Konstanten lauten $K_M=38,7 \mu\text{M}$ und $V_{\max}=31 \text{ s}^{-1}$ für das ungehemmte Enzym sowie $V_{\max}=13,3, 6,8$ und $5,5 \text{ s}^{-1}$ für 0,06, 0,2 und 1 μM Ebselen.

In Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen (Schewe et al., 1994), schützte das Vorhandensein von Reagenzien mit SH-Gruppen im Vorinkubationsansatz (Glutathion, Merkaptoethanol) die LOX vor Inaktivierung.

3.2.2.2 Ebselen bindet kovalent an die 15-LOX

Es ist bekannt, dass Ebselen mit SH-Gruppen reagiert (Ullrich et al., 1996) und die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX enthält 15 freie Cysteine (Rapoport et al., 1979). Um herauszufinden, inwieweit die LOX durch Ebselen kovalent verändert wird, wurden Versuche mit radioaktiv markiertem Ebselen durchgeführt. Bei der SDS-PAGE mit LOX-Proben, die mit unterschiedlichen Konzentrationen ^{14}C -Ebselen inkubiert wurden, konnte

bei Abwesenheit von Merkaptoethanol im Probenpuffer eine radioaktiv markierte Hauptbande identifiziert werden, die mit einem authentischen LOX-Standard komigrierte. Die Intensität des Labelings hängt von der eingesetzten ^{14}C -Ebselen-Konzentration ab (Abb. 24).

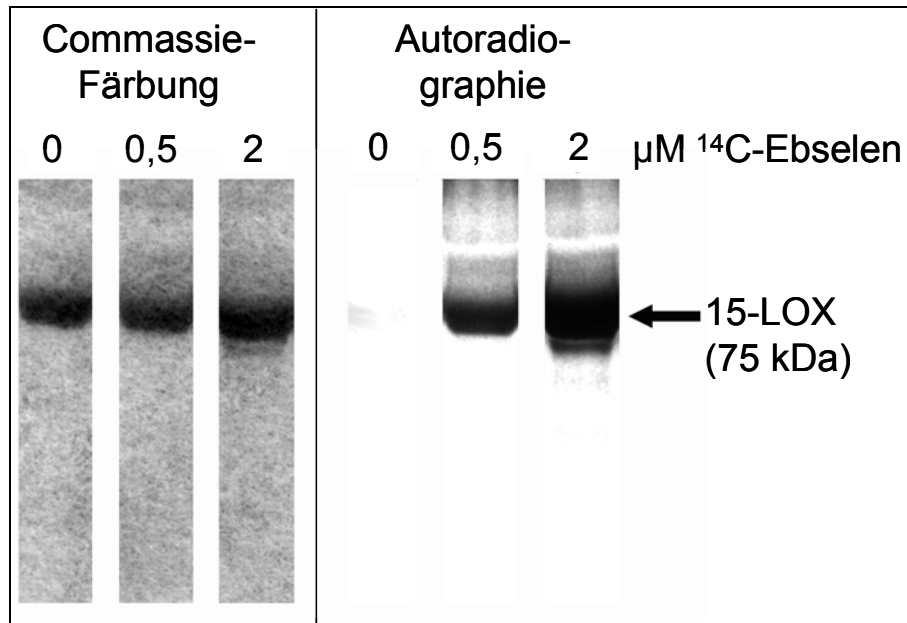


Abb. 24: SDS-PAGE von LOX-Proben, die mit verschiedenen Mengen ^{14}C -Ebselen inkubiert wurden (Coomassie-Färbung und Autoradiographie). Die Elektrophorese wurde in Abwesenheit von Merkaptoethanol durchgeführt. Die Radioaktivität komigriert zusammen mit der 15-LOX.

Bei Vorhandensein von Merkaptoethanol im Probenpuffer konnte keine Radioaktivität mehr nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die kovalente Bindung des Ebselens an der LOX durch SH-Reagenzien aufgehoben werden kann. Um dies zu bestätigen und um die Stöchiometrie der LOX-Ebselen-Wechselwirkung zu untersuchen, wurden Dialyse-Experimente durchgeführt:

Hierzu wurde die LOX mit einem Überschuss ^{14}C -Ebselen inaktiviert und dieser Ansatz anschließend einer Langzeit-Dialyse unterzogen (30 h). Freies Ebselen konnte durch die Dialyse-Membran gelangen, während diese für die LOX undurchlässig war. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Dialyseschlauch entnommen und die Radioaktivität durch Flüssig-Szintillationszählung bestimmt. In Abb. 25 ist der Dialyse-Verlauf aufgetragen. Zunächst sinkt die gemessene Radioaktivität während der ersten 2 h, bleibt dann aber nahezu konstant. Quantifizierung ergab, dass etwa 10-12 nmol Ebselen pro nmol LOX gebunden bleiben. Der Großteil der 15 in der LOX vorhandenen freien Cysteine muss für Ebselen also zugänglich sein. Übereinstimmend konnten in der

Untersuchung der Enzymoberfläche der Kristallstruktur zehn sichtbare Cysteinreste ermittelt werden.

Führt man die Dialyse in Gegenwart von 1 mM Glutathion durch, so wird wesentlich mehr Radioaktivität aus dem Dialyseschlauch entfernt (Abb. 25). Nach 8 h beträgt das Ebselen/LOX-Verhältnis nur noch 2,7:1, nach 30 h sinkt dieser Wert auf 1,6:1. Dies bestätigt das Ergebnis aus der Elektrophorese, wonach der Großteil des enzymgebundenen Ebselens durch SH-Reagenzien entfernt werden kann.

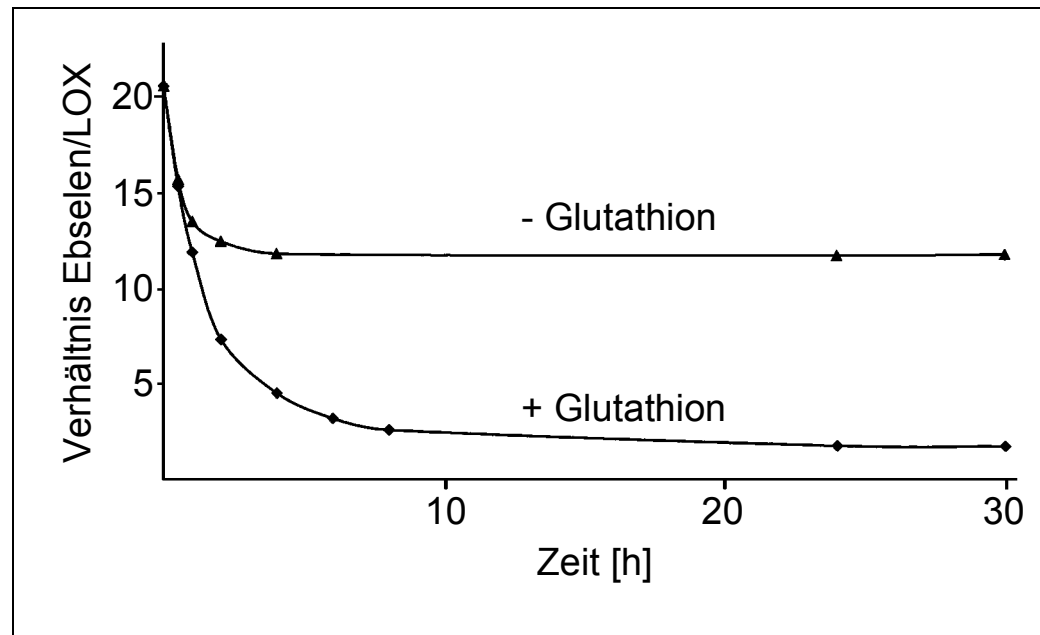


Abb. 25: Verlauf der Dialyse von LOX-Proben, die mit einem Überschuss an ^{14}C -Ebselen inkubiert wurden, mit und ohne Glutathion im Dialysepuffer. Aufgetragen ist das Mengenverhältnis von Ebselen zu LOX in Abhängigkeit von der Dialysedauer.

Leider konnte dieses Experiment nicht Auskunft darüber geben, ob das Entfernen des enzymgebundenen Ebselens die LOX-Aktivität wieder herstellt, da die LOX bei Langzeit-Dialyse inaktiviert wird. Um dies zu umgehen, wurde eine konzentrierte LOX-Probe durch Ebselen inaktiviert und anschließend unterschiedliche Konzentrationen Glutathion zugesetzt. Nach Entfernen der Komponenten mit geringem Molekulargewicht (freies Ebselen, freies Glutathion, Ebselen-Glutathion-Komplex) durch Gelfiltration, wurde die Enzymaktivität bestimmt. Im Gegensatz zu einer Probe ohne Ebselen-Zusatz, bei der 80% der Reaktivität nach dieser Behandlung erhalten blieben, konnte keine Wiederherstellung der LOX-Aktivität nach Entfernen des Ebselens beobachtet werden. Möglicherweise ist also die Bindung an freie SH-Gruppen des Enzyms nicht die einzige Ursache für die Hemmwirkung des Ebselens.

3.2.2.3 Ebselen verändert die Eisenligandensphäre der 15-LOX

Es wurde bereits beschrieben, dass Selen-Verbindungen in der Lage sind, Enzym-gebundenes Eisen zu komplexieren (Conradson et al., 1994). Da LOXn ein Nichthämeisen im aktiven Zentrum enthalten, könnte also dessen Komplexierung durch Ebselen zu der Hemmung beitragen. Die hiermit einhergehende Veränderung der Eisenligandensphäre kann durch Röntgen-Absorptionsspektroskopie untersucht werden. Nachdem die Struktur-Modellierung des Ebselens in die Bindungstasche der Kaninchen-Retikulozyten-15-LOX mit Hilfe des Programms Hyperchem keine größeren sterischen Hinderungen ergab, wurden EXAFS-Spektren der nativen LOX und des Ebselen-behandelten Enzyms aufgenommen und ausgewertet.

Die nach der Datenreduktion erhaltenen energienormierten Feinstrukturen des EXAFS-Bereichs zeigten deutliche Unterschiede zwischen der nativen LOX und der Ebselen-behandelten Probe (Abb. 26). Bereits aus diesen Spektren kann gefolgert werden, dass durch die Inkubation mit Ebselen die Eisenligandensphäre der LOX verändert wird.

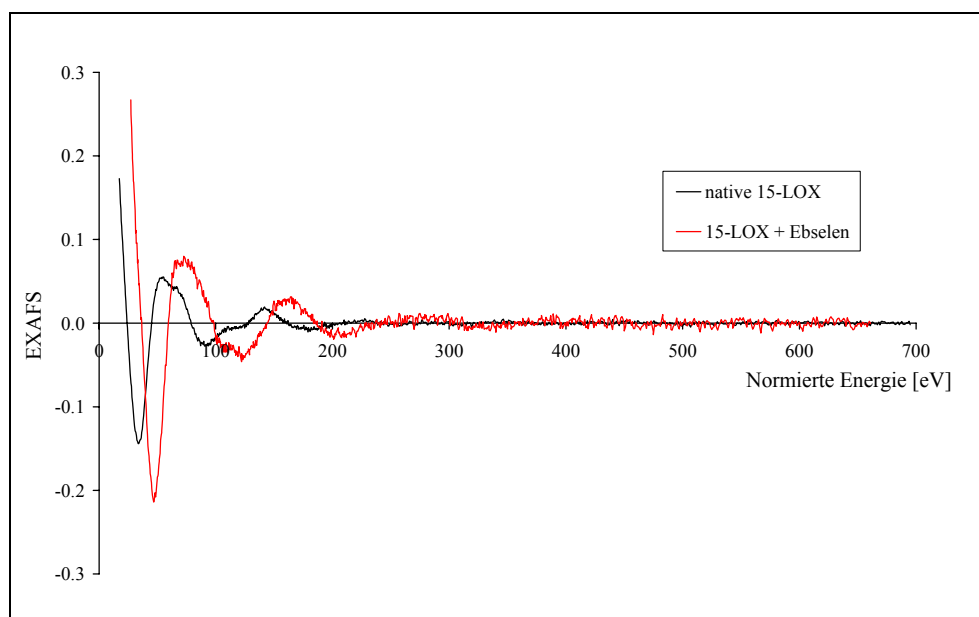


Abb. 26: EXAFS-Spektren der nativen 15-LOX und des Ebselen-behandelten Enzyms. Es sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden Spektren zu erkennen.

Zur Untersuchung der Ligandengeometrie der LOX und des LOX-Ebselen-Komplexes wurde das EXAFS-Signal mit dem Programm Excurve 92 ausgewertet. Hierzu wurden die Spektren von Modellen der Eisenligandensphäre ausgehend von der LOX-Kristallstruktur mit hineinmodelliertem Wasser bzw. Ebselen berechnet und an die experimentellen Daten schrittweise angepasst. Für beide Varianten konnte eine gute Übereinstimmung zwischen

theoretischem und experimentellem Spektrum erzielt werden (Abb. 27). Hierdurch wurde in beiden Fällen ein sechsfach koordiniertes Eisen bestätigt.

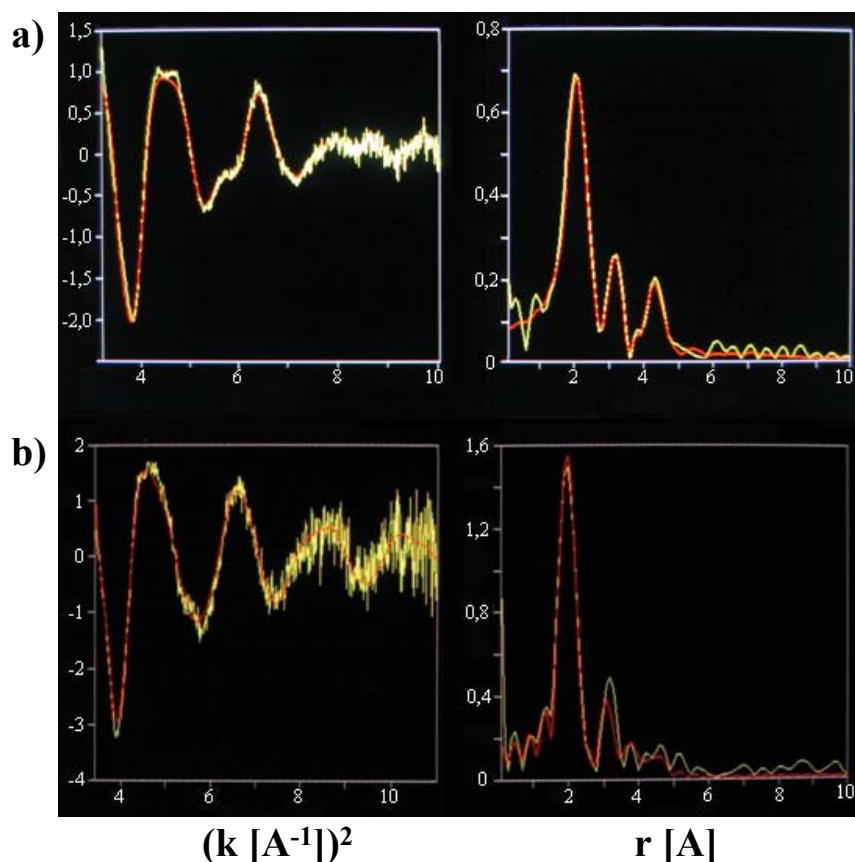


Abb. 27: Auswertung der EXAFS-Spektren der nativen LOX (a) und des LOX-Ebselen-Komplexes (b) mit dem Programm Excurve 92. Dargestellt ist jeweils die gewichtete Feinstruktur k und die entsprechende phasenkorrigierte Fourier-Transformation, aus der sich die Abstände ermitteln lassen. Rot: theoretisches Spektrum; gelb: experimentelle Daten

In Abb. 28 sind die Eisenligandensphären mit den aus den EXAFS-Untersuchungen ermittelten Abständen in Å dargestellt, wie sie sich aus der Verfeinerung der Modelle ergaben. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Ebselen das Wasser als sechsten Eisenliganden unter Ausbildung einer Eisen-Selen-Wechselwirkung verdrängt. Es muss betont werden, dass aus den EXAFS-Signalen nur die allgemeinen Abstände ermittelt werden können, die Zuordnung eines bestimmten Abstandes zu einem Liganden erfolgte nur aus dem Modell.

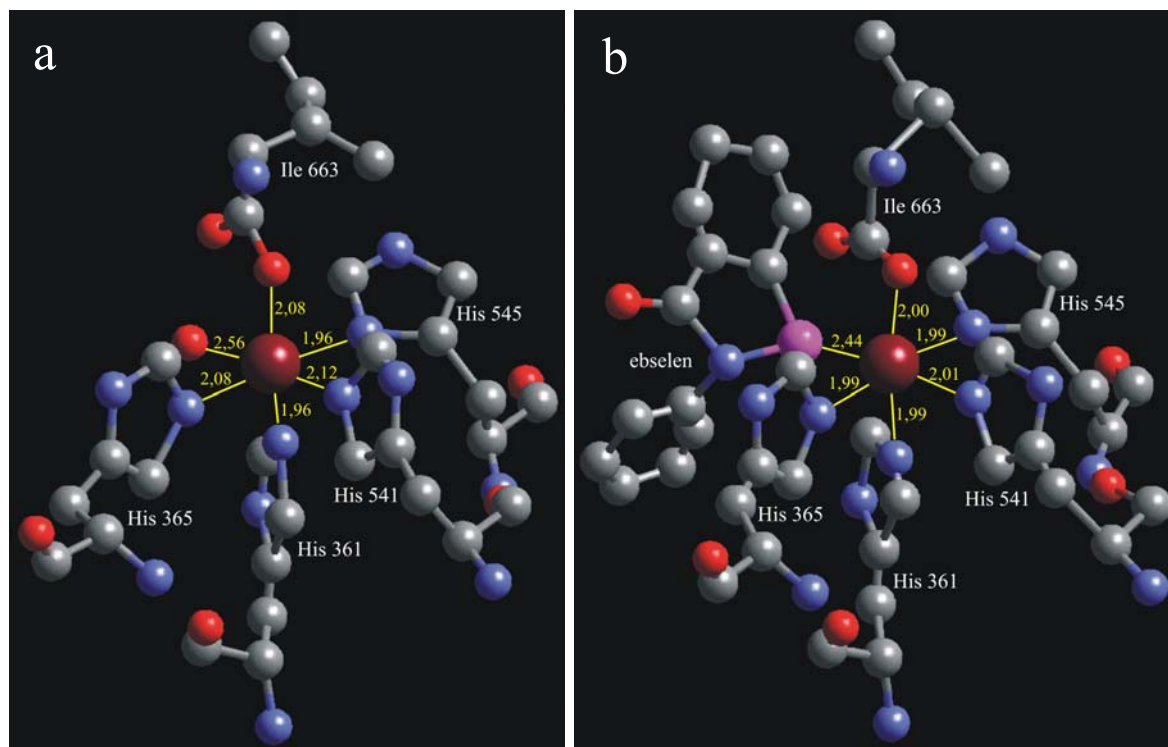


Abb. 28: Modelle der Eisenligandensphäre der nativen LOX (a) und des LOX-Ebselen-Komplex (b). Die Abstände in Å wurden aus den EXAFS-Messungen ermittelt. Für beide Modelle ergibt sich ein sechsfach koordiniertes Eisen mit leicht verzerrter oktaedrischer Anordnung. Das Wasser wurde durch Ebselen als sechsten Liganden ersetzt.

3.2.2.4 Die katalytisch aktive Eisen[III]-LOX wird durch Ebselen kompetitiv gehemmt

Wird die 15-LOX nicht mit Ebselen vorinkubiert sondern zu einem Ansatz aus Substrat und Ebselen gegeben, so tritt eine starke Verminderung der Hemmwirkung des Ebselens ein. Unter identischen Bedingungen stieg der IC_{50} -Wert von 65 nM mit Vorinkubation auf 7 μ M ohne Vorinkubation. Diese Veränderung beruht nicht auf einer chemischen Modifizierung des Ebselens, wie durch HPLC-Analyse gezeigt wurde (ohne Abbildung). Detaillierte Untersuchung des Hemmmechanismus ergab, dass die katalytisch aktive Eisen[III]-LOX reversibel durch Ebselen inhibiert wird. Das Lineweaver-Burk-Diagramm deutet in diesem Fall auf eine kompetitive Hemmung der LOX durch Ebselen hin (Abb. 29). Daraus lässt sich schließen, dass Ebselen mit dem Substrat um die Bindung am aktiven Zentrum konkurriert.

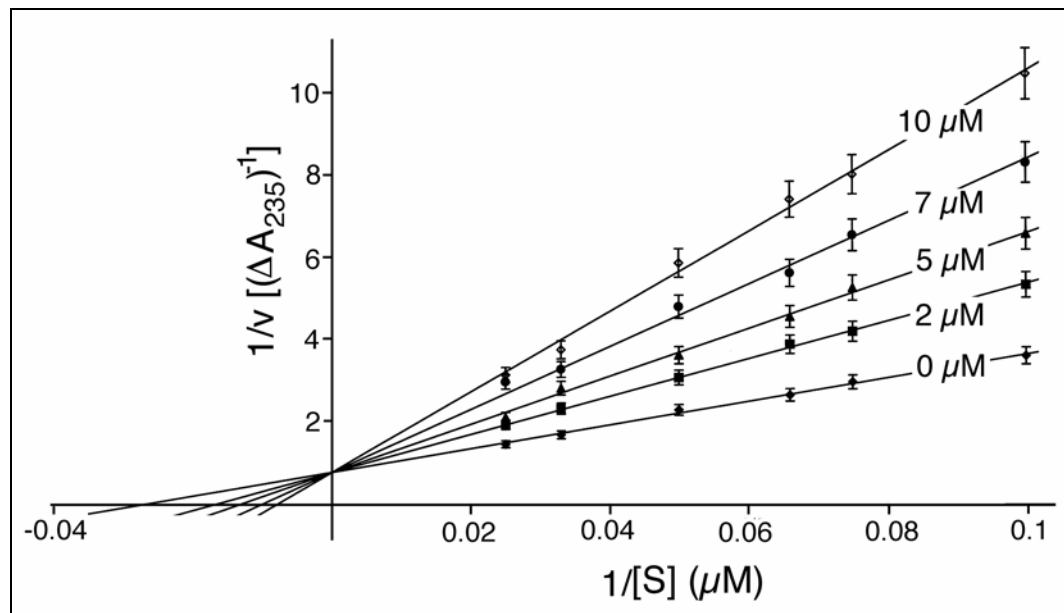


Abb. 29: Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der aktiven Fe[III]-LOX durch Ebselen. Die 15-LOX wurde zu einem Ansatz aus Substrat und Ebselen (verschiedene Konzentrationen) gegeben und die Enzymaktivität photometrisch bestimmt. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Messungen. Der Schnittpunkt der Geraden auf der Ordinate deutet auf eine kompetitive Hemmung hin.

3.2.2.5 Die kinetische Modellierung der Hemmung zeigt einen dualen Mechanismus

Wie aus Abb. 23 ersichtlich, wird die katalytisch inaktive Fe[II]-LOX durch Ebselen irreversibel gehemmt. Trägt man die Restaktivitäten des Enzyms nach Inkubation mit unterschiedlichen Ebselen-Konzentrationen semilogarithmisch auf, ergibt sich für diese Art der Hemmung typischerweise ein sigmoider Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung. Wie Abb. 30 zeigt, weicht jedoch der Verlauf oberhalb Konzentrationen von $0,2 \mu\text{M}$ Ebselen signifikant von einer sigmoiden Kurve (Hill-Modell) ab, was auf einen biphasischen Mechanismus schließen lässt. Möglicherweise überlappen sich also zwei oder auch mehr Hemmmechanismen. Die Punkte in Abb. 30 entsprechen den experimentell ermittelten Werten, die Kurven wurden nach Gleichung (2) (s. u.) ermittelt.

Die experimentellen Werte der LOX-Hemmung durch Ebselen ließen vermuten, dass die irreversible Hemmung der LOX nur bis zu einem gewissen Grad erfolgt. Die Ebselen-modifizierte LOX scheint noch eine Restaktivität zu entwickeln (Abb. 31). Diese Restaktivität könnte möglicherweise nur noch kompetitiv hemmbar sein. Der Kurvenverlauf wurde nach Gleichung (2) (s. u.) ermittelt. Die gute Übereinstimmung von experimentellen Daten und theoretisch berechnetem Kurvenverlauf bestätigt das Modell.

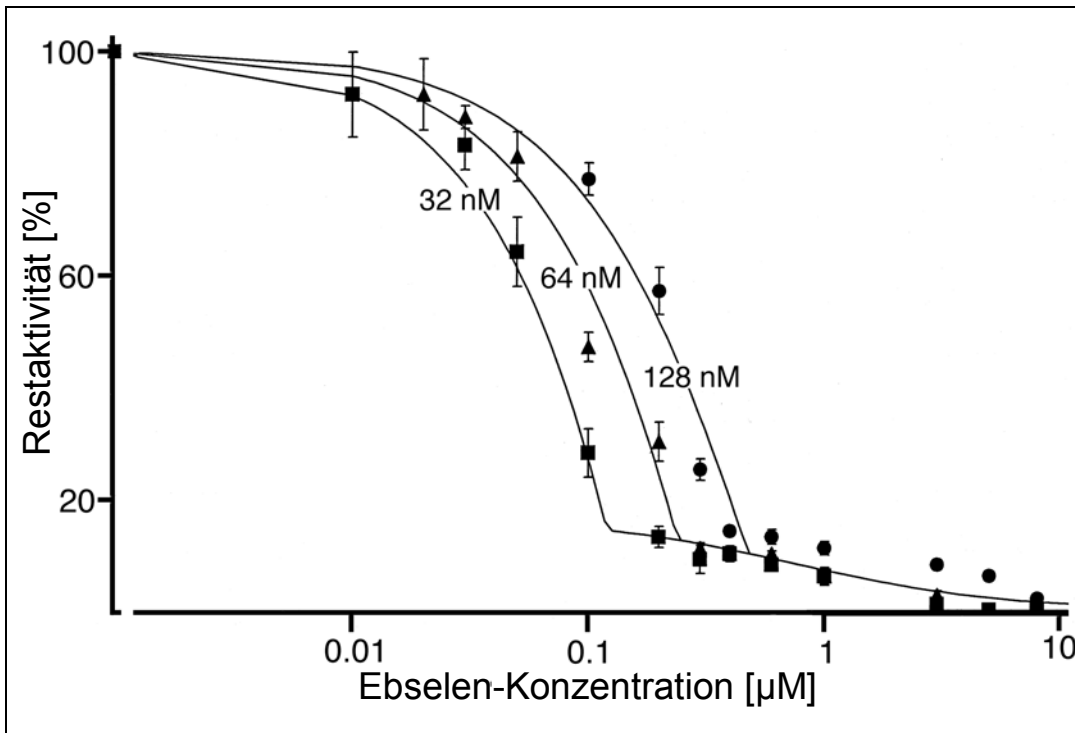


Abb. 30: Semilogarithmische Darstellung der Hemmung der LOX durch unterschiedliche Ebselen-Konzentrationen. Aufgetragen sind die Restaktivitäten dreier LOX-Konzentrationen nach Vorinkubation mit Ebselen (Punkte: Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen \pm Standardabweichung, Kurven: Verlauf berechnet nach Gleichung (2))

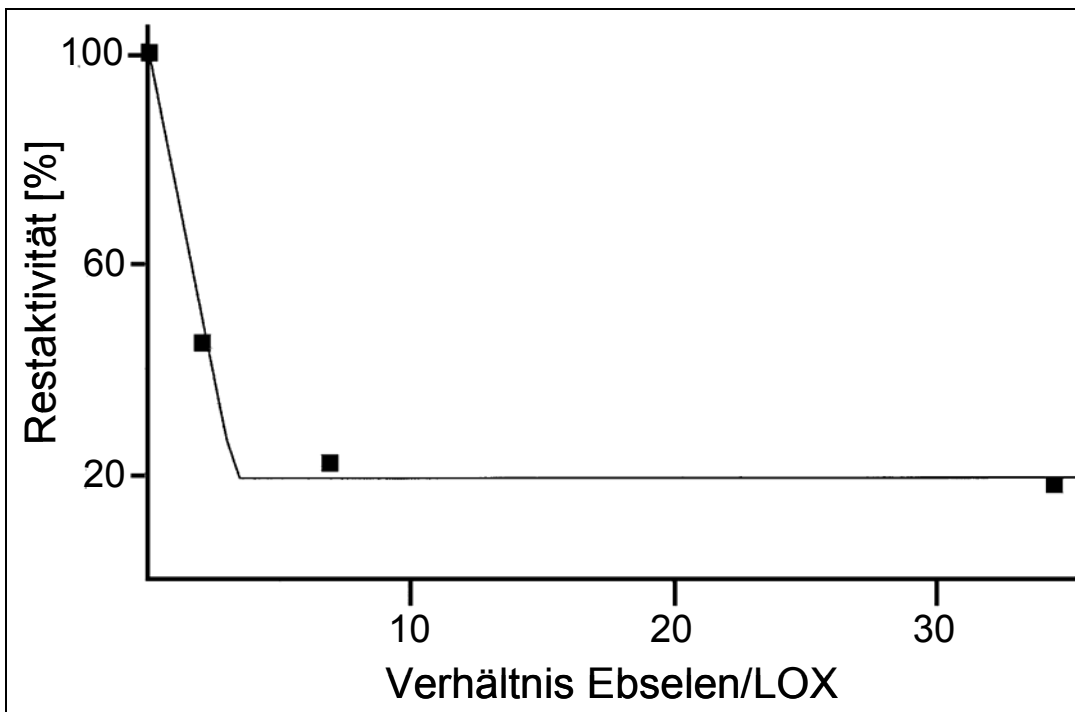


Abb. 31: Restaktivitäten in Abhängigkeit vom Ebselen/LOX-Verhältnis. Ebselen und LOX wurden vorinkubiert und anschließend die spez. Aktivität der LOX anhand der Linolsäureoxygenierung photometrisch bestimmt. Die Punkte entsprechen den experimentellen Werten, der Kurvenverlauf wurde nach Gleichung (2) berechnet.

Aus den experimentellen Ergebnissen lässt sich ein kinetisches Modell für die möglichen LOX-Ebselen-Wechselwirkungen erstellen (Abb. 32). Wird das Grundzustandsenzym Fe[II]-LOX (E_0) durch Substrat (S) bzw. das Enzymprodukt (P) in die aktive Form E_a (Fe[III]-LOX) überführt, so konkurrieren Ebselen (ebs) und Substrat (S) um die Bindung am aktiven Zentrum (kompetitive Hemmung). Die zugehörigen Affinitäten werden durch die Konstanten K_i für das Ebselen und K_{Ma} für das Substrat beschrieben. Die Fe[II]-LOX (E_0) wird darüber hinaus durch Ebselen kovalent modifiziert (E^*). Dieses modifizierte Enzym besitzt eine Restaktivität, auch hier konkurrieren wieder Substrat und Ebselen um das aktive Zentrum. Die zugehörigen Affinitätskonstanten unterscheiden sich von denen des aktiven Enzyms und werden mit K_M^* für das Substrat und K_i^* für Ebselen bezeichnet. Aus den Komplexen E_a -S und E^* -S entsteht jeweils das LOX-Produkt, die Enzym-Ebselen-Komplexe E_a -ebs und E^* -ebs sind katalytisch inaktiv.

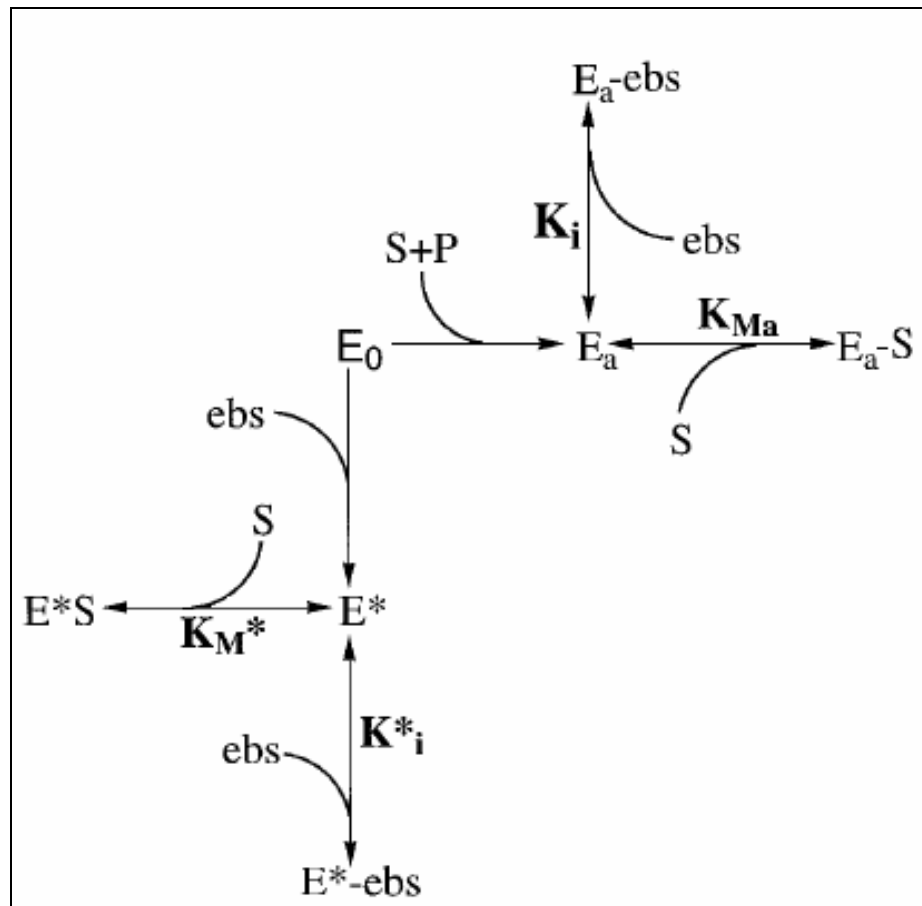


Abb. 32: Kinetisches Modell für die Hemmung der 15-LOX durch Ebselen. E_0 : Grundzustandsenzym Fe[II]-LOX, E_a : katalytisch aktive Fe[III]-LOX, E^* : Ebselen-modifizierte LOX, K_i und K_{Ma} : Affinitätskonstanten der aktiven LOX für Ebselen und Substrat, K_i^* und K_M^* : Affinitätskonstanten der Ebselen-modifizierten LOX für Ebselen und Substrat, S: Substrat, P: LOX-Produkt, ebs: Ebselen, E_a -S und E^* -S: Enzym-Substrat-Komplexe (bilden das LOX-Produkt), E_a -ebs und E^* -ebs: Enzym-Ebselen-Komplexe (katalytisch inaktiv)

Nach diesem Modell lässt sich die Hemmung der LOX durch Ebselen durch zwei Gleichungen beschreiben:

$$(1) \text{ Aktivität [\%]} = \frac{K_{Ma} + [S]}{K_{Ma}(1 + \frac{[ebs]}{K_i}) + [S]}$$

$$(2) \text{ Aktivität [\%]} = [100 + (A_0 - 100) \frac{[ebs]}{n[E_0]}] \frac{K_M^* + [S]}{K_M^*(1 + \frac{[ebs]}{K_i^*}) + [S]}$$

Für die Beschreibung der Symbole vergleiche Abb. 32 und Tab. 11.

Gleichung (1) beschreibt die kompetitive Hemmung der katalytisch aktiven Fe[III]-LOX. Gleichung (2) beschreibt die biphasische Hemmung ausgehend von der Grundzustands-Fe[II]-LOX: Der erste Term beinhaltet die irreversible Hemmung der Fe[II]-LOX, welche noch eine Restaktivität entwickelt, während der zweite Term die kompetitive Hemmung der durch Ebselen modifizierten LOX beschreibt. In Gleichung (2) gibt n die Zahl der für eine maximale irreversible Hemmung nötigen Ebselen-Moleküle pro LOX-Molekül an.

Für die Hemmung der LOX durch Ebselen wurden folgende Konstanten aus den experimentellen Ergebnissen bzw. aus dem Fit der beiden Gleichungen an die Ergebnisse ermittelt (Tab. 11):

Tab. 11: Kinetische Parameter der LOX-Hemmung durch Ebselen ermittelt aus experimentellen Ergebnissen und dem Fit der Gleichungen (1) und (2) mit dem SIMFIT Software-Paket

Parameter	Bedeutung	ermittelter Wert
K_i	Kompetitive Hemmung der katalytisch aktiven LOX	4,1 μM
K_i^*	Kompetitive Hemmung der Ebselen-modifizierten LOX	0,03 μM
E^*	Restaktivität der Ebselen-modifizierten LOX	17%
n	Zahl der Ebselen-Moleküle für max. irrevers. Hemmung	3,3
K_{Ma}	Substrataffinität der katalytisch aktiven LOX	38,7 μM
K_M^*	Substrataffinität der Ebselen-modifizierten LOX	10,7 μM

Der Vergleich der ermittelten Konstanten zeigt, dass die Affinität der aktiven Fe[III]-LOX für Ebselen um fast eine Größenordnung höher zu sein scheint als die für Linolsäure ($K_i=4,1 \mu\text{M}$ gegenüber $K_{Ma}=38,7 \mu\text{M}$). Die Modifizierung der LOX durch Ebselen erhöht sowohl die Substrataffinität ($K_M^*=10,7 \mu\text{M}$) als auch die Affinität für Ebselen ($K_i^*=0,03 \mu\text{M}$). Durch die Wechselwirkung mit Ebselen in Abwesenheit von Substrat wird die Fe[II]-LOX zu maximal 83% durch chemische Modifizierung gehemmt (kovalente Bindung an SH-Gruppen und/oder Eisenkomplexierung). Dazu sind 3-4 Ebselen-Moleküle pro LOX notwendig.

3.3 Trunkationsexperimente und Membranbindungsstudien

Aus der Kristallstruktur der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX ist eine deutliche Zweidomänen-Struktur ersichtlich, wobei die helikale C-terminale Domäne knapp 4/5 des Enzyms ausmacht und das gesamte aktive Zentrum enthält. Die N-terminale β -Faltblatt-Domäne hingegen weist eine zu den tierischen Lipasen ähnliche Struktur und Sequenz auf (Gillmor et al., 1997). Da in diesen Enzymen das entsprechende C-terminale Element für die Anlagerung an Lipoproteine verantwortlich gemacht wird, liegt der Schluss nahe, dass die N-terminale β -Faltblatt-Domäne eine ähnliche Rolle bei der 15-LOX spielt. Dies wird unterstützt durch zwei oberflächenexponierte hydrophobe Aminosäuren in der 15 LOX, Phe70 und Leu71, die im Sequenzvergleich mit der humanen Lipoprotein Lipase mit zwei Tryptophanen übereinstimmen, die als Bindungsdeterminanten an Lipoproteine identifiziert wurden (Gillmor et al., 1997; Williams et al., 1994).

Da die C-terminale Domäne das gesamte aktive Zentrum enthält, besteht die Möglichkeit, dass eine Trunktionsmutante, der die N-terminale Domäne fehlt, dennoch katalytisch aktiv ist. Eine N-terminale Trunkation führt jedoch oft zu falsch gefalteten Proteinen. Bisherige Versuche dieser Art führten auch zu inaktiven Enzymspezies (Borngraber et al., 1999). Um diese Ergebnisse zu überprüfen und um den Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Membranbindung zu untersuchen, wurden der Wildtyp und eine N-terminale Trunktionsmutante exprimiert und in Aktivitätsassays und Membranbindungsversuchen eingesetzt.

3.3.1 Deletion der N-terminalen β -Faltblatt-Domäne führt zu einer enzymatisch aktiven verkürzten LOX

Überraschenderweise ist es in diesem Fall gelungen, eine verkürzte, enzymatisch aktive LOX zu exprimieren, deren Sequenz nach dem His-tag mit der Aminosäure Cys115 startet. Damit fehlt dieser Trunktationsmutante die gesamte N-Terminale β -Faltblatt-Domäne. Im Folgenden wurden einige der enzymatischen Eigenschaften untersucht und mit dem Wildtyp verglichen.

Wie aus Abb. 33 ersichtlich, ist die Positionsspezifität der Trunktationsmutante (C-Terminus) nahezu identisch mit der des Wildtyps. Auch die Stereospezifität des Hauptproduktes, 15-H(P)ETE bleibt erhalten (Abb. 33 Insert).

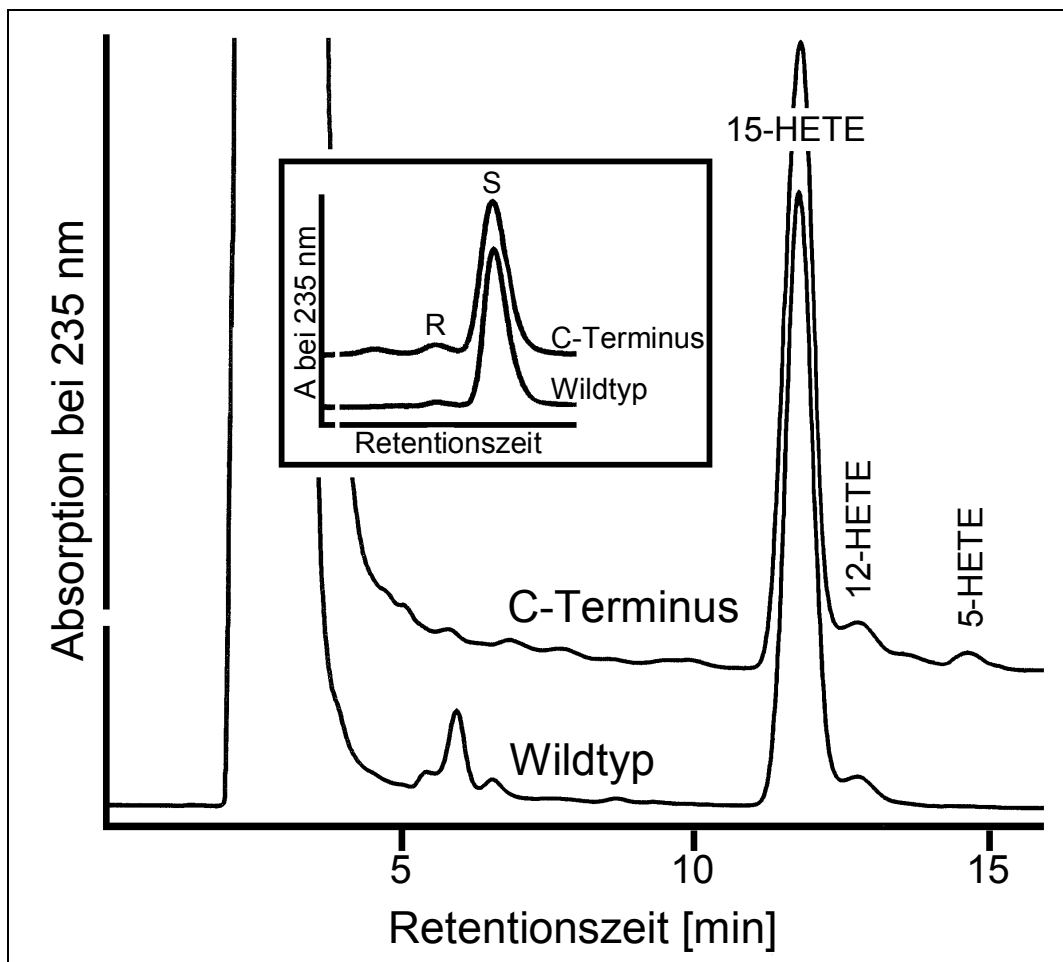


Abb. 33: HPLC-Chromatogramm der Arachidonsäure-Umsätze mit der rekombinanten WT-LOX und deren Trunktationsmutante (C-Terminus). Insert: Chiralität des Hauptproduktes 15-H(P)ETE.

Darüber hinaus gibt es jedoch einige Unterschiede zwischen den beiden Enzymspezies, wenn man die katalytischen Eigenschaften und die Substratspezifität näher untersucht.

Beim Reaktionsverlauf der Arachidonsäureumsetzung im photometrischen Assay fallen zwei Unterschiede auf (Abb. 34):

1. Beim C-Terminus konnte keine kinetische lag-Phase festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass die Aktivierungsmechanismen unterschiedlich sein könnten.
2. Der C-Terminus verliert seine Reaktivität wesentlich schneller als der Wildtyp. Da die Reaktivität durch Zusatz von weiterem Substrat nicht wieder hergestellt werden konnte, ist im Vergleich zum Wildtyp von einer schnelleren Selbstinaktivierung auszugehen.

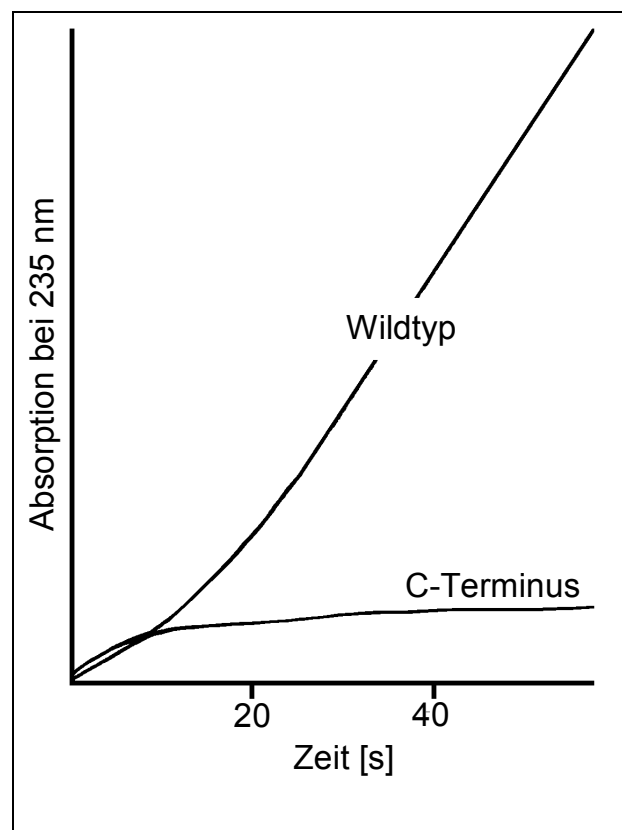


Abb. 34: Reaktionsverlauf der Arachidonsäureumsetzung mit der WT-LOX und der Trunktationsmutante (C-Terminus)

Die kinetischen Parameter ermittelt aus einem Lineweaver-Burk-Plot zeigen etwa vergleichbare K_M -Werte. Der V_{\max} des C-Terminus ist jedoch etwa sechsfach geringer als beim Wildtyp (Tab. 12). Daraus lässt sich schließen, dass die Substratbindung bei der Trunktationsmutante wahrscheinlich nur minimal gestört ist (vergleichbarer K_M -Wert), der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der LOX-Reaktion, die Wasserstoffabstraktion, jedoch beeinflusst wird. Die pH-Optima sind vergleichbar, beim C-Terminus war eine geringe Verschiebung zu saurem pH-Wert festzustellen (Tab. 12).

Tab. 12: Kinetische Konstanten und pH-Optimum des WT-Enzyms und der Trunktationsmutante für den Umsatz von Arachidonsäure

Parameter	Wildtyp	Trunktationsmutante
K_M	11.4 μM	7.0 μM
V_{\max}	9.8 s^{-1}	1.6 s^{-1}
pH-Optimum	7.0-7.5	6.5-7.0

Die Untersuchung der Oxygenaseaktivität der beiden Enzym-Spezies mit verschiedenen Substratfettsäuren ergab wiederum einige Unterschiede hinsichtlich der Substratspezifität (Tab. 13). Während die besten Substrate für den rekombinanten Wildtyp Linolsäure und die Eicosatriensäure waren, sind es für den C-Terminus die beiden Linolensäuren. Diese Unterschiede sind jedoch rein quantitativer Natur, qualitative Unterschiede wie Veränderungen in der Produktzusammensetzung wurden nicht beobachtet (ohne Abb.).

Tab. 13: Relative Oxygenaseaktivität der WT-LOX und der Trunktationsmutante mit verschiedenen Substraten. Der Umsatz von Arachidonsäure wurde auf 100 gesetzt.

Substrat	Relative Oxygenaseaktivität (%)	
	Wildtyp	C-Terminus
5,8,11,14:C ₂₀ , Δ -6 (Arachidonsäure)	100	100
8,11,14:C ₂₀ , Δ -6 (8,11,14-Eicosatriensäure)	199	72
9,12:C ₁₈ , Δ -6 (Linolsäure)	203	89
9,12,15:C ₁₈ , Δ -3 (α -Linolensäure)	121	233
6,9,12:C ₁₈ , Δ -6 (γ -Linolensäure)	133	142

Weitergehende Trunktationsversuche mit Enzymspezies, die mit den Aminosäuren Gly155, Glu165, Phe175 bzw. Pro197 starteten, ergaben inaktive Enzyme, die daher nicht näher untersucht wurden.

3.3.2 Die N-terminale Domäne ist nicht essentiell für die Membranbindung

In den vorhergehenden Experimenten wurde gezeigt, dass die N-terminale Domäne für die LOX-Reaktion nicht essentiell ist, freie Fettsäuren werden auch durch die Trunktationsmutante oxygeniert. Um den Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Bindung an Biomembranen zu testen, wurden zunächst Oxygenierungsversuche durchgeführt. Hierzu wurden der Wildtyp und der C-Terminus mit Biomembranen, z. B. submitochondrialen Partikeln (SMP), inkubiert und die Produkte anschließend analysiert (Abb. 35).

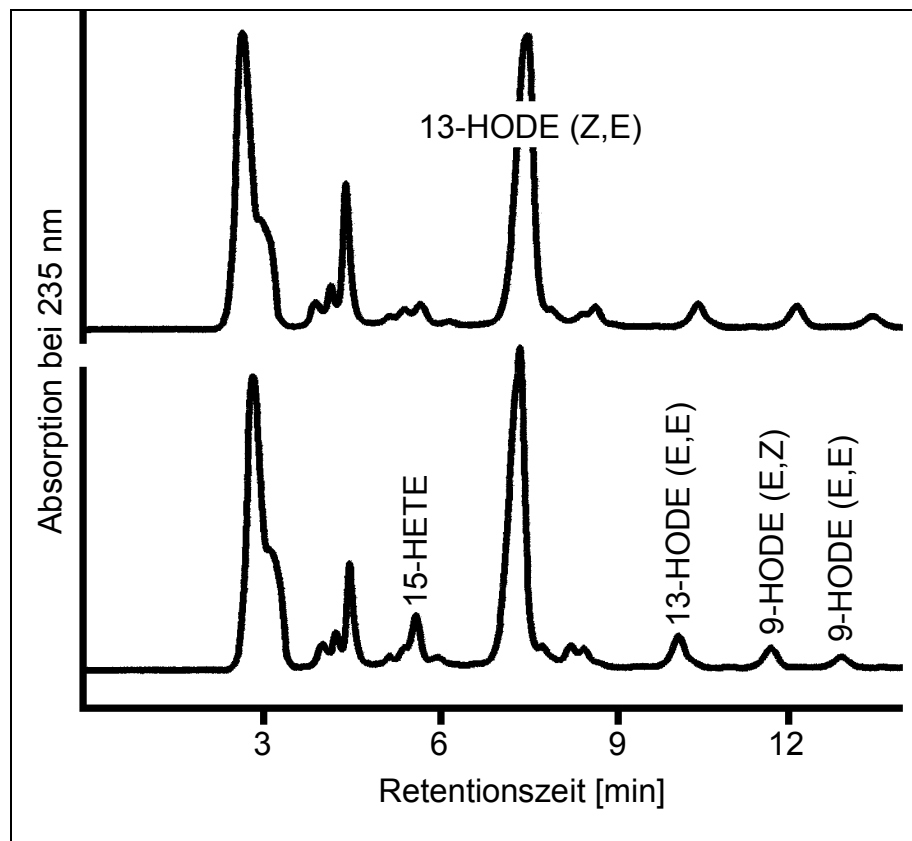


Abb. 35: Produkte des Umsatzes von Biomembranen mit der WT-LOX (oben) und der Trunktionsmutante (C-Terminus, unten). Dargestellt sind SP-HPLC-Chromatogramme.

Es zeigte sich, dass auch die Trunktationsmutante in der Lage ist, Biomembranen zu oxygenieren und dass die Produktzusammensetzung mit der des Wildtyps identisch ist. Allerdings beträgt die Membranoxygenaseaktivität der Trunktationsmutante nur $0,003 \text{ s}^{-1}$, was im Vergleich zu der des Wildtyps ($0,066 \text{ s}^{-1}$) deutlich geringer ist.

Um die Membranbindungskapazitäten des Wildtyps und der Trunktationsmutante direkt vergleichen zu können, wurde ein Membranbindungsassay eingeführt. Hierbei wurde das Enzym mit Biomembranen (SMP) inkubiert und nach hochtouriger Zentrifugation über einem Sacharose-Kissen der membrangebundene Anteil durch Immunoblotten bestimmt. Aus Abb. 36 ist ersichtlich, dass der größte Teil des Wildtyp-Enzyms im Membranpellet gefunden wurde (durchschnittlich 80%), was für eine effektive Membranbindung des Enzyms in diesem Assay spricht. Im Gegensatz dazu wurden durchschnittlich nur 44% des C-Terminus im Pellet gefunden, d.h. die Membranbindung ist hier wesentlich geringer. Dies deutet darauf hin, dass die N-terminale Domäne an der Membranbindung der 15-LOX zwar beteiligt, jedoch nicht essentiell ist, da auch die Trunktationsmutante in den Versuchen zu einem deutlichen Anteil an Membranen gebunden vorlag. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es Determinanten für die Membranbindung sowohl in der N-terminalen als auch in der C-terminalen katalytischen Domäne geben muss.

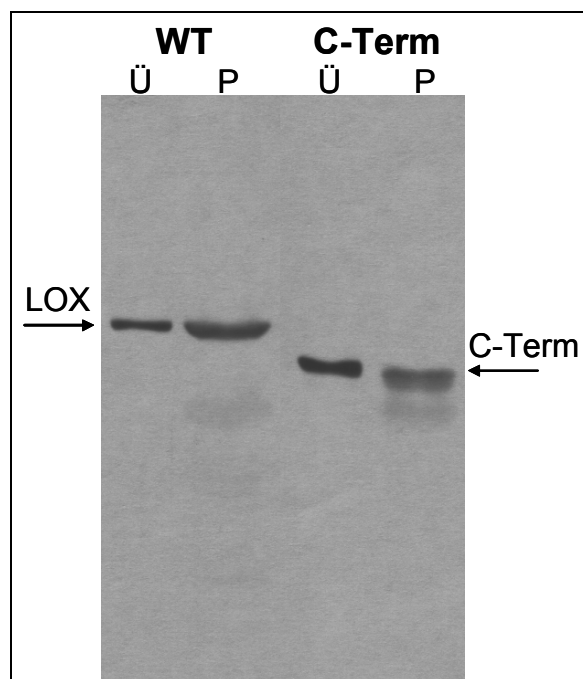


Abb. 36: Membranbindungsfähigkeit des Wildtyp-Enzyms (WT) und der Trunktationsmutante (C-Term). Dargestellt ist der Röntgenfilm nach Western Blot analog dem Membranbindungsassay. Ü: Überstand (ungebundener LOX-Anteil), P: Pellet (membrangebundener LOX-Anteil).

Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Membranbindung des Wildtyp-Enzyms ergab, dass es sich um einen relativ schnellen Prozess handeln muss. Ein Vergleich der membrangebundenen Anteile zu verschiedenen Zeitpunkten zeigte in einem Zeitraum von 5 min bis 2 h keine Veränderungen (ohne Abbildung).

3.3.3 Der Austausch von oberflächenexponierten, hydrophoben zu geladenen Aminosäuren führt zu einer verringerten Membranbindungsfähigkeit

Wie bereits erwähnt, besteht eine strukturelle Ähnlichkeit der N-terminalen Domäne der LOX mit der C-terminalen Domäne der humanen Lipoprotein Lipase. Insbesondere die bei diesem Enzym identifizierten Membranbindungsdeterminanten finden eine Entsprechung bei der LOX in zwei oberflächenexponierten hydrophoben Aminosäuren, Phe70 und Leu71. Um den Einfluss dieser beiden Aminosäuren auf die Membranbindung zu überprüfen, wurden ortsgerichtete Mutagenesen zu geladenen Aminosäuren mit ähnlichen sterischen Eigenschaften durchgeführt (Phe70His, Leu71Lys und Phe,Leu70,71His,Lys). Die entsprechenden Enzymspezies wurden als His-tag Proteine in *E. coli* exprimiert und gereinigt und anschließend in Aktivitätsassays sowie dem Membranbindungsassay eingesetzt.

Aus Tab. 14 ist ersichtlich, dass die Mutanten eine geringere Membranbindungsfähigkeit besitzen als der Wildtyp. Dieser Effekt ist jedoch nicht additiv, da sich die Doppelmutante kaum anders verhält als die Einzelmутanten. Die Arachidonsäureoxygenaseaktivität ist vergleichbar mit der des Wildtyps.

Tab. 14: Vergleich der Aktivitäten und Membranbindungseigenschaften der WT-LOX mit verschiedenen Mutanten lokalisiert in der N-terminalen Domäne. Für die Membranbindungseigenschaften sind die Mittelwerte dreier Experimente +/- Standardabweichung angegeben.

LOX-Spezies	Arachidonsäureoxygenaseaktivität (s^{-1})	rel. Membran-oxygenaseaktivität (%)	membrangebundener Anteil (%)	ungebundener Anteil (%)
Wildtyp	11.4	100	80 ± 8	20 ± 8
F70H	12.7	98.0	55 ± 3	45 ± 3
L71K	8.9	63.4	48 ± 7	52 ± 7
F70H+L71K	10.2	72.7	45 ± 10	55 ± 10

Es konnte also gezeigt werden, dass zwei oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren der N-terminalen Domäne an der Membranbindung der LOX beteiligt sind. Da in vorhergehenden Experimenten gefunden wurde, dass es in der C-terminalen Domäne

ebenfalls Membranbindungsdeterminanten geben sollte, liegt der Schluss nahe, dass es sich auch hier um oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren handelt. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst die Kristallstruktur der LOX untersucht. Leider ist die Struktur unvollständig, unter anderem fehlt ein wichtiger Bereich in der Nähe des Eingangs zum aktiven Zentrum (Aminosäuren 177-188). Aus diesem Grund wurde ein Modell erstellt, in welches die fehlenden Aminosäuren als Helix hineinmodelliert sind. In diesem Modell wurde nach hydrophoben Aminosäuren gesucht, deren lösungsmittlexponierter Anteil größer als 35% ist. Es wurden 21 entsprechende Aminosäuren gefunden, darunter Phe70 und Leu71 in der N-terminalen Domäne (Abb. 37).

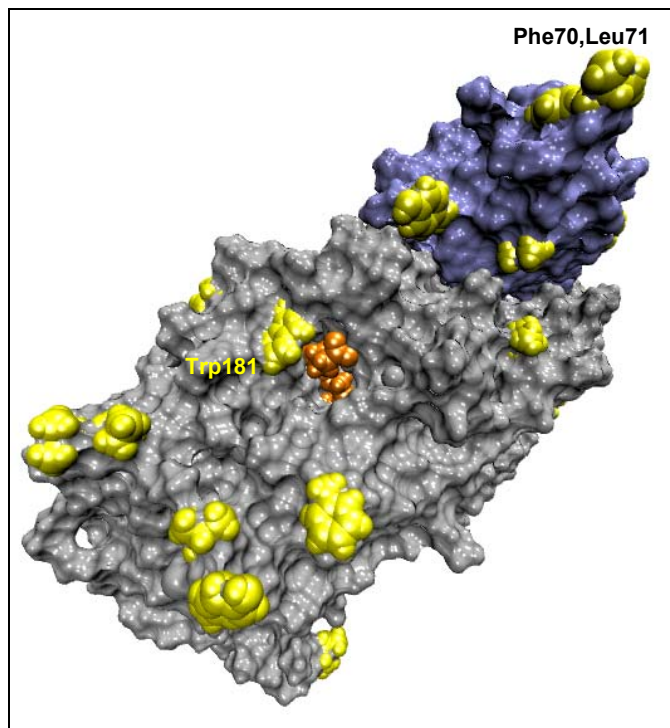


Abb. 37: Oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX (gelb). Blau: N-terminale Domäne, grau: C-terminale Domäne, orange: in die Bindungstasche modellierte Arachidonsäure.

Da davon auszugehen ist, dass eine Membranbindung der LOX so erfolgt, dass Substrate Zugang zum aktiven Zentrum haben, sollten Membranbindungsdeterminanten in etwa auf der gleichen Seite des Enzyms liegen, wie der Eingang zum aktiven Zentrum. Dies ist für 12 der 21 Aminosäuren der Fall, darunter wiederum die bereits als Bindungsdeterminanten identifizierten Phe70 und Leu71. Von diesen 12 verbleibenden Aminosäuren wurde Trp181 zunächst untersucht. Es liegt direkt neben dem Eingang zur Substratbindungstasche, wobei es Bestandteil der modellierten Helix ist. Die genaue Lage der Seitenkette ist daher unbekannt.

Trp181 wurde gegen eine Reihe von Aminosäuren ausgetauscht. So erfolgten Mutationen zu Alanin, Glutamat und Lysin. Von diesen Mutanten sollte das geladene Glutamat den größten Effekt zeigen. Alanin ist zwar im Protein ebenfalls hydrophob, besitzt aber keine exponierte Seitenkette und die Lysin-Mutante erfolgte aus einem Sequenzvergleich, aus dem hervorgeht, dass an Stelle des Trp181 in vielen LOXn, u. a. dem menschlichen Homolog, ein Lysin zu finden ist. In Tab. 15 ist die Membranbindungsfähigkeit der einzelnen Trp181-Mutanten dargestellt.

Tab. 15: Membranbindungsfähigkeit von Trp181-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Mittelwerte dreier Experimente +/- Standardabweichung)

LOX-Spezies	membrangebundener Anteil (% im Pellet)	ungebundener Anteil (% im Überstand)
Wildtyp	80 ± 8	20 ± 8
W181A	60 ± 2	40 ± 2
W181E	21 ± 6	79 ± 6
W181K	57 ± 3	43 ± 3

Diese Ergebnisse belegen, dass Trp181 ebenfalls einen großen Einfluss auf die Membranbindungsfähigkeit der 15-LOX hat. Damit wurde also auch in der C-terminalen Domäne eine Membranbindungs-determinante identifiziert. Wie erwartet, hat der Austausch des hydrophoben Trp181 zu einem geladenen Glutamat den größten Effekt, der membrangebundene Enzymanteil verringert sich von 80% für den Wildtyp auf 21% für die Trp181Glu-Mutante.

Vergleicht man die Oxygenaseaktivitäten des Wildtyps mit denen der Trp181Ala- und Trp181Glu-Mutanten, so fällt auf, dass die Membranoxygenaseaktivität mit der schlechteren Membranbindung der Mutanten stark abnimmt (Tab. 16). Darüber hinaus ist jedoch auch der Umsatz freier Fettsäuren gestört, was vermutlich auf die Nähe des Trp181 zum Eingang der Substratbindungstasche zurückzuführen ist. Das Vorhandensein eines geladenen Glutamats könnte die Substratbindung negativ beeinflussen.

Tab. 16: Vergleich der Arachidonsäure- und Membranoxygenaseaktivitäten der Trp181-Mutanten mit dem Wildtyp

LOX-Spezies	Arachidonsäureoxy- genaseaktivität (s^{-1})	Membranoxy- genaseaktivität (s^{-1})
Wildtyp	11.6	0.066
W181A	8.4	0.034
W181E	0.72	0.010

Die Untersuchung der Doppelmutante Phe,Leu70,71His,Lys in der N-terminalen Domäne ergab keinen additiven Effekt der beiden Mutationen, die Membranbindung der Doppelmutante war kaum geringer als die der beiden Einzelmutanten. Um zu überprüfen, ob es einen solchen Effekt bei gleichzeitigem Austausch von Aminosäuren in der N- und der C-terminalen Domäne gibt, wurde die Doppelmutante Phe70His,Trp181Ala eingeführt. Die Ala-Mutante wurde gewählt, da bei Trp181Glu die Membranbindung bereits so schlecht war, dass ein zusätzlicher Effekt durch eine weitere Mutation möglicherweise nicht detektierbar gewesen wäre. Wie sich zeigte, sank der membrangebundene Enzymanteil von 55% bzw. 60% der Einzelmutanten auf 36% bei der Doppelmutante (Tab. 17). Es ist also davon auszugehen, dass sowohl der N-Terminus als auch die C-terminale Domäne in einer konzertierten Aktion an der Membranbindung der LOX beteiligt sind.

Tab. 17: Einfluss einer Doppelmutante in der N- und C-terminalen Domäne auf die Membranbindung

LOX-Spezies	membrangebundener Anteil (% im Pellet)	ungebundener Anteil (% im Überstand)
Wildtyp	80 ± 8	20 ± 8
F70H	55 ± 3	45 ± 3
W181A	60 ± 2	40 ± 2
F70H+W181A	36 ± 13	64 ± 13

Um weitere Membranbindungs determinanten zu identifizieren, wurden eine Reihe der oberflächenexponierten, hydrophoben Aminosäuren in ein Glutamat ausgetauscht. Im Einzelnen waren dies Tyr15 in der N-terminalen Domäne und Leu195, Tyr292 und Phe412 im C-Terminus. Die Membranbindungsfähigkeit dieser Mutanten wurde im Membranbindungsassay überprüft und ist in Abb. 38 dargestellt.

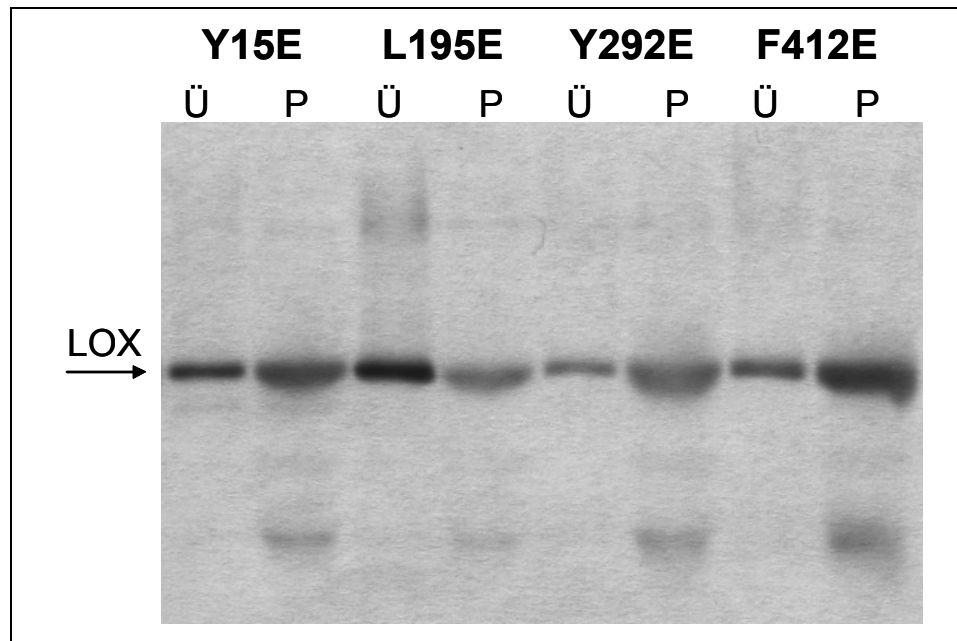


Abb. 38: Membranbindungsfähigkeit verschiedener Mutationen von oberflächenexponierten, hydrophoben Aminosäuren in ein Glutamat. Dargestellt ist der Röntgenfilm nach Western Blot. Ü: Überstand (ungebundener LOX-Anteil), P: Pellet (membrangebundener LOX-Anteil).

In Tab. 18 ist die Quantifizierung verschiedener Bindungs-Experimente zusammengefasst.

Tab. 18: Untersuchung des Einflusses weiterer oberflächenexponierter, hydrophober Aminosäuren auf die Membranbindung durch Mutation in ein Glutamat

LOX-Spezies	membrangebundener Anteil (% im Pellet)	ungebundener Anteil (% im Überstand)
Wildtyp	80 ± 8	20 ± 8
Y15E	47 ± 6	53 ± 6
L195E	32 ± 5	68 ± 5
Y292E	69 ± 2	31 ± 2
F412E	69 ± 3	31 ± 3

Von diesen vier Mutanten haben also nur zwei, Tyr15Glu und Leu195Glu, einen deutlichen Einfluss auf die Membranbindung. Die beiden anderen Aminosäuren, Tyr292 und Phe412, spielen bei der Membranbindung höchstens eine geringe Rolle. In Abb. 39 ist die Lage der identifizierten Bindungs determinanten dargestellt.

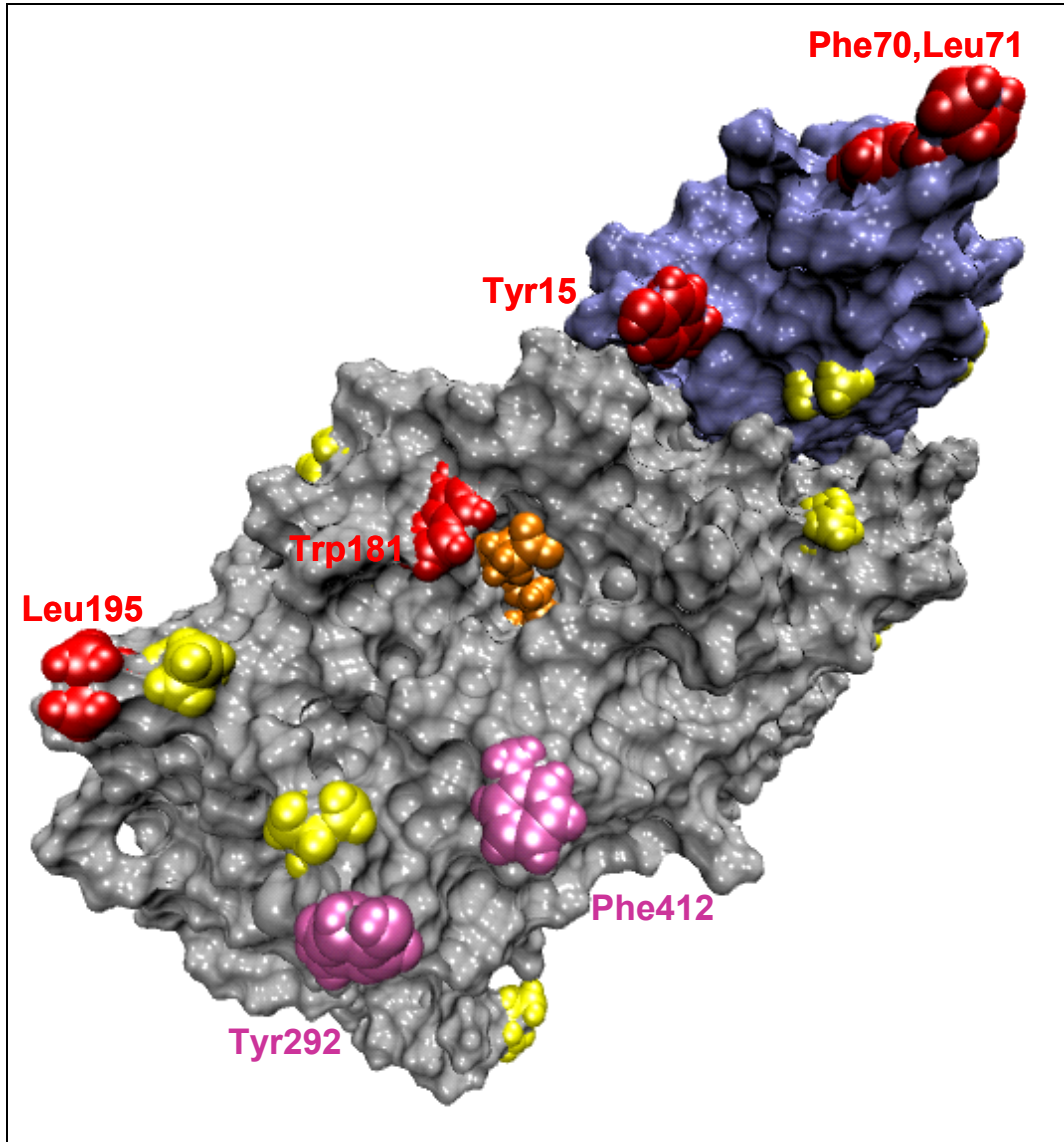


Abb. 39: Struktur der LOX mit den identifizierten Determinanten für die Membranbindungsfähigkeit in rot, untersuchte Aminosäuren ohne Einfluss in violett, weitere oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren in gelb (nicht untersucht). Blau: N-terminale Domäne, grau: C-terminale Domäne, orange: in die Bindungstasche modellierte Arachidonsäure.

Zur weiteren Verringerung der Membranbindungsfähigkeit der LOX wurden nun Mehrfachmutanten eingeführt. Es wurde die N-terminale dreifach Mutante Tyr15Glu,Phe70His, Leu71Lys, die C-terminale Doppelmutterante Trp181Glu,Leu195Glu sowie die vierfach Mutante Tyr15Glu,Phe70His,Leu71Lys,Leu195Glu exprimiert und deren Membranbindungsfähigkeit untersucht (Abb. 40, Tab. 19)

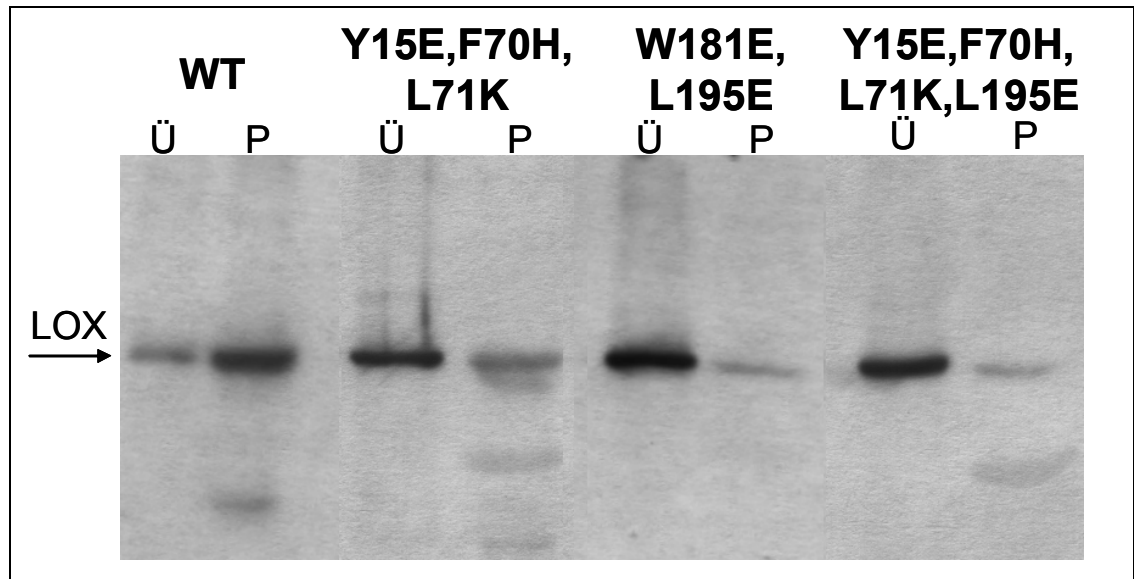


Abb. 40: Membranbindungsfähigkeit verschiedener Mehrfachmutanten von oberflächenexponierten, hydrophoben Aminosäuren. Dargestellt ist der Röntgenfilm nach Western Blot analog dem Membranbindungsassay. Ü: Überstand (ungebundener LOX-Anteil), P: Pellet (membrangebundener LOX-Anteil).

Tab. 19: Vergleich der Membranbindungsfähigkeit von Mehrfachmutanten

LOX-Spezies	membrangebundener Anteil (% im Pellet)	ungebundener Anteil (% im Überstand)
Wildtyp	80 ± 8	20 ± 8
Y15E,F70H,L71K	22 ± 4	78 ± 4
W181E,L195E	13 ± 5	87 ± 5
Y15E,F70H,L71K,L195E	14 ± 2	86 ± 2

Der Austausch von hydrophoben, oberflächenexponierten Aminosäuren vor allem zu einem geladenen Glutamat führt also zu einer drastischen Verringerung der Membranbindungsfähigkeit der 15-LOX. Daraus lässt sich schließen, dass die 15-LOX durch hydrophobe Wechselwirkungen an Membranen bindet. Dies geschieht unter Beteiligung oberflächenexponierter, hydrophober Aminosäuren, die sowohl in der N-terminalen als auch in der C-terminalen, katalytischen Domäne lokalisiert sind.

3.3.4 LOX-Mutanten mit verringerter Membranbindungsfähigkeit sind weniger in der Lage, luminal Proteine aus Mikrosomen freizusetzen

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung der Membranoxygenaseaktivitäten verschiedener LOX-Mutanten ergibt sich aus der Fähigkeit der nativen LOX, porenartige Strukturen in Membranen zu verursachen (van Leyen et al., 1998). Dieser Vorgang könnte bei dem Abbau von Zellorganellen eine Rolle spielen. Die Poren besitzen eine ausreichende Größe, um die Membran für Proteine durchlässig zu machen. Modellmembranen (EKRM) wurden mit der jeweiligen LOX-Spezies inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Nach Ultrazentrifugation wurde der Anteil des luminalen Enzyms PDI im Membranpellet und im Überstand bestimmt. Dabei konnte die PDI nur in den Überstand gelangen, wenn die Membran durch Inkubation mit der LOX durchlässig wurde. In Abb. 41 sind die Zeitabhängigkeiten der PDI-Freisetzung für die WT-LOX und die beiden Mutanten Y15E,F70H,L71K und Y15E,F70H,L71K,L195E aufgetragen. Dabei ist zu erkennen, dass die Fähigkeit, luminal Proteine freizusetzen, insbesondere für die vierfach-Mutante stark verringert wurde.

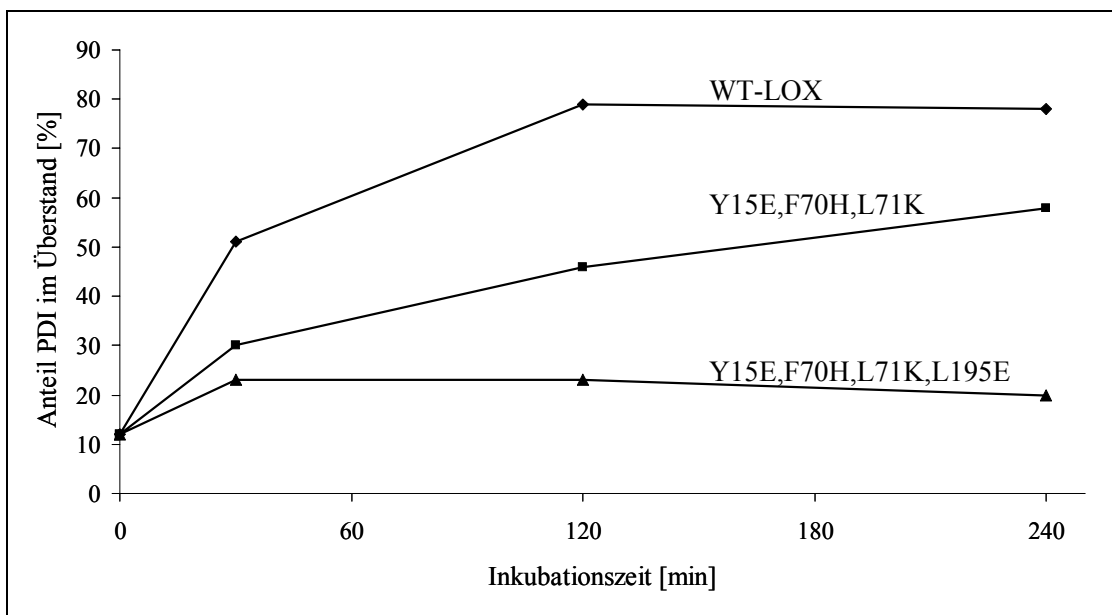


Abb. 41: Zeitabhängigkeit der Freisetzung von PDI aus EKRM durch die WT-LOX und die Mutanten Y15E,F70H,L71K sowie Y15E,F70H,L71K,L195E. Die Freisetzung von PDI ist bei den beiden Mehrfachmutanten deutlich geringer als beim WT. In einem Kontrollexperiment ohne Enzymzusatz betrug der ermittelte Anteil an PDI im Überstand 13%.

Auch dieses Experiment bestätigt also, dass der Austausch von oberflächenexponierten, hydrophoben Aminosäuren in geladene Reste zu einer Verringerung der Membranoxygenaseaktivität führt.

Es ist zu betonen, dass für den Versuch gleiche Linolsäureoxygenaseaktivitäten eingesetzt wurden, d.h. eine Verringerung der spezifischen LOX-Aktivität aufgrund der Mutationen wurde durch einen entsprechend höheren Einsatz von Enzym ausgeglichen. Dadurch wurde eine geringere PDI-Freisetzung aufgrund allgemein geringerer LOX-Aktivität ausgeschlossen. Der beobachtete Effekt sollte also vor allem auf die geringere Membranbindungsfähigkeit der Mutanten zurückzuführen sein.

4 Diskussion

4.1 Enzymreinigung

In der gegenwärtigen Literatur werden LOXn mit einer Vielzahl von physiologischen Prozessen (Zellreifung, Biosynthese von Botenstoffen usw.) und der Pathogenese von Krankheiten (z. B. Karzinogenese, Atherosklerose) in Verbindung gebracht. Oftmals sind allerdings die veröffentlichten Ergebnisse widersprüchlich oder zumindest nicht eindeutig. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte einfache Reinigungsstrategie, die vom Bakterienlysat in zwei Schritten zum elektrophoretisch reinen, rekombinanten Enzym führt (Abb. 13 und Abb. 14), kann dazu beitragen, offene Fragen zu beantworten. Zum einen wird der tierexperimentelle Aufwand zur Gewinnung von LOXn umgangen, der z. B. bei der Reinigung aus Kaninchenblut nötig wäre, zum anderen können Enzymmutanten in größeren Mengen und vor allem als sauberes Protein bereitgestellt werden. Dadurch ist es möglich, durch Fremdproteine verursachte Effekte auszuschließen. Auch für andere LOXn, z. B. die 12R-LOX, wurde diese Reinigungsstrategie inzwischen erfolgreich eingesetzt (Meruvu, unveröffentlichte Ergebnisse). Weitere mögliche Anwendungen für die so gereinigten LOXn sind die Immunisierung von Tieren und nachfolgende Gewinnung von spezifischen Antikörpern, sowie Kristallisationsversuche. Insbesondere bei letzteren werden große Mengen sauberen Proteins benötigt, die über diese Reinigungsstrategie zugänglich sein sollten. Bisher ist von tierischen LOXn nur die Struktur eines Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX-Inhibitor-Komplexes bekannt (2,4 Å Auflösung). Es besteht also großer Bedarf an weiteren Strukturinformationen, die zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen und zur Entwicklung von neuen, spezifischen Inhibitoren von großem Nutzen wären. Ein weiteres Problem bei der Kristallisation von LOXn könnte durch Ergebnisse dieser Arbeit möglicherweise gelöst werden. Versuche mit der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX ergaben, dass dieses Enzym dazu neigt, in konzentrierten Lösungen hochmolekulare Aggregate zu bilden. Dies führt zu Problemen bei der Kristallisation. Erste Versuche mit den Mutanten, bei denen oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren in geladene Aminosäuren ausgetauscht wurden, insbesondere mit der vierfach Mutante Y15E,F70H, L71K,L195E, ergaben eine deutlich geringere Tendenz zur Aggregatbildung, was mit Kleinwinkelstreuungsexperimenten nachgewiesen wurde (Prassl, Akademie der Wissenschaften, Graz, unveröffentlichte Ergebnisse).

4.2 LOX-Substrat-Wechselwirkung und Reaktionsmechanismus

Gegenwärtig wird die Positionsspezifität von LOXn für eine Einteilung dieser Enzyme verwendet. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine unveränderbare Enzymeigenschaft. Vielmehr ist die Positionsspezifität abhängig von der Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum. Modifizierungen des Substrats (Hamberg und Samuelsson, 1967; Kuhn et al., 1990; Schwarz et al., 1998) und/oder Punktmutationen kritischer Aminosäuren (Borngraber et al., 1999; Gan et al., 1996; Schwarz et al., 2001; Sloane et al., 1991) verändern die Positionsspezifität von LOXn durch die Beeinflussung der Substratbindung.

4.2.1 Substratbindung bei 12/15-Lipoxygenasen

Für 12- und 15-LOXn wird allgemein angenommen, dass die Substratfettsäure mit ihrem Methylende in die Substratbindungstasche eintaucht (Abb. 8) (Kuhn et al., 1986; Lehmann, 1994). Obwohl der direkte Beweis dieser Art der Substratbindung noch aussteht, beispielsweise durch Strukturdaten von LOX-Substrat-Komplexen, existiert eine Vielzahl von experimentellen Ergebnissen, die diese Theorie unterstützen. Hierzu zählt u. a. die Änderung der Positionsspezifität der 15-LOX in Richtung 12-Lipoxygenierung durch Verkleinerung der Seitenketten kritischer Aminosäuren. Die hierdurch erreichte Vergrößerung der Substratbindungstasche ermöglicht es der Fettsäure, tiefer einzutauchen, wodurch statt C-13 das Kohlenstoffatom C-10 der Arachidonsäure in die Nähe des Eisens gelangt. Diese Verschiebung der Positionsspezifität wurde hier auch für die His-tag-Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX und deren Mutanten I418A, F353L und I593A bestätigt.

Es wurde bereits beschrieben, dass 15-LOXn in der Lage sind, 5-Lipoxygenierung zu katalysieren, wenn eine 15-Lipoxygenierung aufgrund der strukturellen Eigenschaften des Substrats nicht möglich ist. So katalysieren die Soja-LOX-1 und auch die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX die Bildung von 5S,15S-diHPETE (Schwarz et al., 1998; Van Os et al., 1981) aus 15S-HETE. In diesem Fall könnte das Substrat invers, d.h. mit der Carboxylgruppe in der Bindungstasche, gebunden sein. Die gefundenen deutlich höheren K_M -Werte für diese Reaktion spiegeln die schlechtere Substratbindung durch Eintauchen der polaren Carboxylgruppe in die hydrophobe Bindungstasche wider.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass unter bestimmten Bedingungen 15-LOXn eine 5-Lipoxygenierung katalysieren, obwohl strukturell die 15-Lipoxygenierung möglich wäre. Auch hier wird als mechanistischer Hintergrund eine inverse

Substratbindung vorgeschlagen und die Produkte aus Umsätzen mit der 12-lipoxygenierenden 15-LOX-Mutante I418A (8-Hydroperoxyverbindungen) unterstützen diese Theorie (Abb. 20). Um eine inverse Bindung zu erzwingen, ist es notwendig, gleichzeitig beide Enden der Substratfettsäure zu modifizieren. Weder die Einführung sterisch anspruchsvoller Gruppen am Methylenende, noch die Veresterung der Carboxylgruppe allein waren für eine vorrangig inverse Bindung ausreichend. Wurden diese beiden Modifizierungen jedoch gleichzeitig bei einem Substrat durchgeführt, scheint die inverse Substratbindung und damit die 5-Lipoxygenierung durch eine 15-LOX favorisiert zu sein.

Man kann die Bindung eines Substrats als Gleichgewichtsreaktion zwischen den beiden möglichen Anordnungen (Methyl- oder Carboxylende in der Bindungstasche) betrachten. Dieses Gleichgewicht wird durch funktionelle Gruppen an beiden Enden des Substrats beeinflusst. Polare oder sterisch anspruchsvolle Gruppen [-OH, -C(CH₃)₃] am Methylenende sollten das Gleichgewicht in Richtung inverse Bindung verschieben. Die relativ hohe Energiebarriere, die mit der Einführung der Carboxylgruppe in die hydrophobe Bindungstasche einhergeht, wirkt dem jedoch entgegen und verhindert möglicherweise eine inverse Bindung. Wird diese Energiebarriere gesenkt, indem z. B. die Carboxylgruppe methyliert und damit ihre Polarität reduziert wird, kann das Gleichgewicht weiter in Richtung inverse Bindung verschoben werden. Der größere Anteil an 5-Lipoxygenierungsprodukten (bzw. 8-Lipoxygenierung im Falle von I418A und F353L), kann als Indiz hierfür angesehen werden. Allerdings muss man betonen, dass die beobachteten Produkte nicht notwendigerweise quantitativ das Bindungsgleichgewicht widerspiegeln müssen. Wird beispielsweise ein invers gebundenes Substrat aus sterischen oder anderen Gründen nicht oder nur sehr schlecht oxygeniert, so entsteht hauptsächlich das Produkt der 'normalen' Substratbindung (hier 15-Lipoxygenierung), obwohl ein großer Anteil inverser Substratbindung stattgefunden hat.

4.2.2 Substratbindung bei der 5-Lipoxygenase

Im Gegensatz zur 15-LOX, für die bereits viele experimentelle Daten zur Substratanlagerung vorlagen, weiß man über die Verhältnisse bei tierischen 5-LOXn relativ wenig. Zurzeit gibt es zwei alternative Hypothesen zur Substratbindung bei 5-LOXn (Abb. 8). Nach der Orientierungshypothese (Prigge et al., 1996; Prigge et al., 1998) binden 5-LOXn im Gegensatz zu den 12- und 15-LOXn Fettsäuren mit der Carboxylgruppe in der Substratbindungstasche. Diese Anlagerung vermag die Stereochemie der 5-LOX-Reaktion gut

zu erklären. Allerdings sollte eine energetische Barriere existieren, die das Eintauchen der polaren Carboxylgruppe in die hydrophobe Bindungstasche stark erschwert.

Die Volumen-Hypothese geht von einer konservierten Substratbindung für alle LOX-Isoformen aus, d.h. die Fettsäure gelangt jeweils mit dem Methylenende in die Substratbindungstasche (Browner et al., 1998). Die Positionsspezifität der LOXn wird durch die Größe der Bindungstasche bestimmt. Bei 5-LOXn erlaubt eine größere Tasche ein tieferes Eintauchen der Fettsäure, wodurch eine Oxygenierung in der Nähe der Carboxylgruppe ermöglicht wird. Strukturmodelle basierend auf Sequenzvergleichen ergaben dementsprechend eine um 20% größere Bindungstasche bei 5-LOXn als bei der 15-LOX (Browner et al., 1998; Gillmor et al., 1997). Der größte Nachteil dieser Hypothese besteht darin, dass sie die Stereochemie der 5S-Lipoxygenierung nur schwer erklären kann. Führt man sich jedoch die Flexibilität der Fettsäuren vor Augen, scheint es möglich, dass eine Konformation eingenommen wird, die das pro-S Wasserstoffatom am C-7 in der Nähe des Wasserstoffakzeptors positioniert.

Bisher wurde keine der beiden Theorien experimentell bewiesen. Da der direkte Nachweis über Struktur-Untersuchungen von 5-LOX-Substrat-Komplexen zurzeit nur schwer möglich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kombination aus ortsgerichteter Mutagenese und gezielter Substratveränderung angewandt. Während die Ergebnisse der 15-LOX katalysierten 5-Lipoxygenierung eine inverse Substratbindung bei diesem Enzym befürworten, deuten die Daten, die für die humane 5-LOX ermittelt wurden, auf eine konservierte Substratbindung hin und würden damit die Volumen-Hypothese bestätigen. So konnte gezeigt werden, dass die Verkleinerung der Substratbindungstasche durch ortsgerichtete Mutagenese die 5-LOX in ein 15-lipoxygenierendes Enzym umwandelt. Darüber hinaus müsste für eine Substratbindung nach der Orientierungstheorie eine Carboxylgruppe in die Enzymtasche eintauchen. Versuche mit der Dicarbonsäure ASR-COOH, einem symmetrischen Molekül dessen Enden beide für eine entsprechende Anlagerung nach der Orientierungstheorie optimal sein sollten, zeigten jedoch, dass sie kein geeignetes Substrat für die 5-LOX ist. Wird hingegen eine der beiden Carboxylgruppen methyliert, erfolgt eine Umsetzung und zwar analog einer konservierten Substratorientierung mit dem weniger polaren Methylester in der Bindungstasche (5-OH-Produkt).

4.2.3 Möglicher Einfluss einer positiv geladenen Aminosäure in der Substratbindungstasche auf die Substratorientierung

Eine inverse Substratorientierung könnte favorisiert sein, wenn sich am Fuß der Bindungstasche eine positiv geladene Aminosäure befände, die mit der negativ geladenen Carboxylgruppe der Fettsäure wechselwirken könnte. Entsprechende Beobachtungen wurden bei der Gurken-Linolsäure-13-LOX gemacht. Im Gegensatz zu den tierischen LOXn, die nach der Arachidonsäureoxygenierungsstelle eingeteilt werden, unterteilt man die pflanzlichen LOXn zumeist analog ihrer Linolsäureoxygenierungsstelle, da Arachidonsäure in Pflanzen praktisch nicht vorkommt. Bei einem Sequenzvergleich von pflanzlichen LOXn zeigte sich, dass der Aminosäurerest, der der Positions determinante 418 der humanen Retikulozyten 15-LOX entspricht, auch bei pflanzlichen Enzymen einen Einfluss auf die Positionsspezifität haben könnte. Bei den pflanzlichen LOXn, die Linolsäure am C-13 oxygenieren, befindet sich dort eine sterisch anspruchsvolle Aminosäure (Phe, His), bei den 9-lipoxygenierenden Enzymen ein kleineres Val. Eine Mutation des entsprechenden His608 der Gurken-Linolsäure-13-LOX in das bei den 9-LOXn an dieser Stelle vorhandene Val führte zu einer Änderung der Positionsspezifität von 13- zu fast ausschließlich 9-Lipoxygenierung (Hornung et al., 1999).

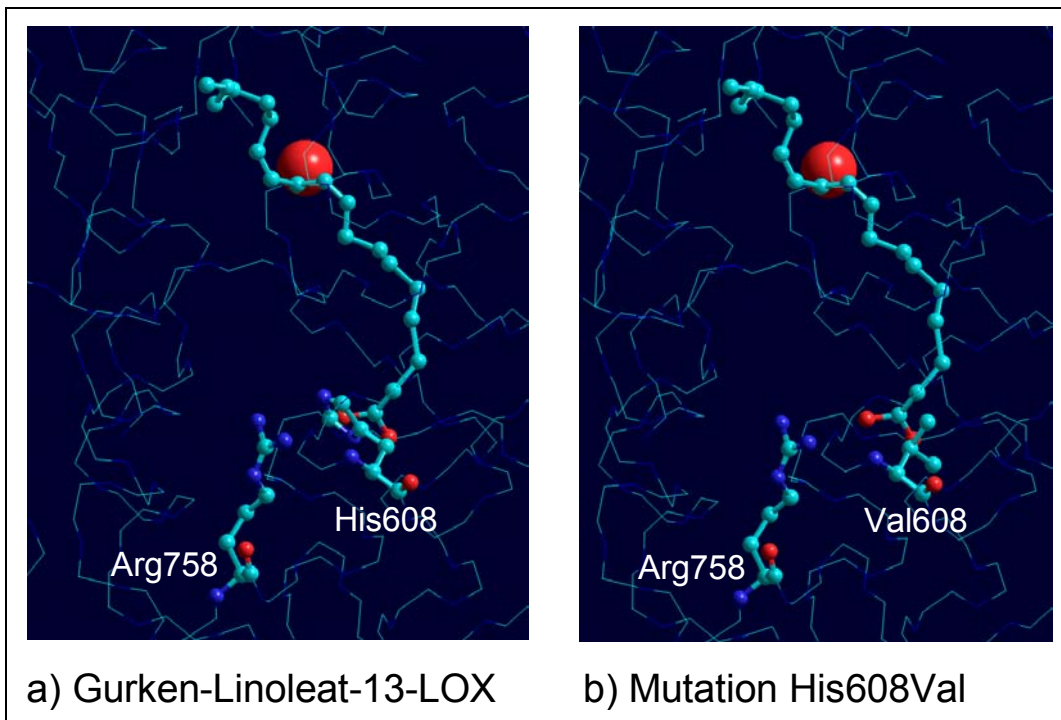


Abb. 42: Linolsäure modelliert in die Bindungstasche der Gurken-13-LOX nach (Hornung et al., 1999). a) His608 schirmt die positiv geladene Aminosäure Arg758 von der Bindungstasche ab und verhindert eine Wechselwirkung mit der Carboxylgruppe der Linolsäure. b) Der Austausch His608Val lässt eine Wechselwirkung zwischen der Carboxylgruppe und Arg758 zu.

Ein Erklärungsansatz hierfür ist eine inverse Substratbindung. In einem Sequenzvergleich wurde bei allen pflanzlichen LOXn ein konserviertes Arg gefunden, welches sich, basierend auf der Soja-LOX-1 Struktur, in der Nähe des Fußes der Substratbindungstasche befindet. In einem Strukturmodell der Gurken-Linolsäure-13-LOX basierend auf der Soja-LOX-1-Struktur ist dieses Arg758 hinter dem verhältnismäßig großen His608 lokalisiert und wird so von der Substratbindungstasche abgeschirmt. Durch die Mutation His608Val wird das positiv geladene Arg möglicherweise von der Substratbindungstasche aus zugänglich und könnte nun mit der negativ geladenen Carboxylgruppe der Linolsäure in Wechselwirkung treten (Abb. 42). Dies müsste die mit dem Eintauchen der Carboxylgruppe in die ansonsten hydrophobe Bindungstasche verbundene Energiebarriere deutlich senken, was zu einer inversen Substratbindung führen könnte (Hornung et al., 1999).

Auch in diesem Fall könnte die veränderte Positionsspezifität durch eine konservierte Substratbindung erklärt werden. Bei der 13-Lipoxygenierung der Linolsäure findet eine [+2] Radikalverschiebung statt (Wasserstoffabstraktion am C-11), bei der 9-Lipoxygenierung eine [-2]-Verschiebung (Wasserstoffabstraktion ebenfalls am C-11). Die Richtung der Radikalverschiebung könnte auf unterschiedlichen Konformationen von Fettsäure und/oder Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum beruhen. Für eine inverse Substratbindung bei der His608Val-Mutante sprechen aber noch zwei weitere Ergebnisse: Substrate mit veresterter Linolsäure, die also keine freie Carboxylgruppe besaßen, wurden auch von dieser Mutante am C-13 oxygeniert, und der zusätzliche Austausch des Arg758 in ein ungeladenes Leu (His608Val,Arg758Leu-Doppelmutante) führte zu einer stark reduzierten Umsatzrate mit nur noch racemischen Oxygenierungsprodukten (Hornung et al., 1999). Diese Ergebnisse unterstützen die Wichtigkeit des Vorhandenseins einer geladenen Gruppe am Fuß der Substratbindungstasche bei dieser Enzymmutante. Weitere Versuche wären nötig, um die Substratbindung bei den pflanzlichen Linolsäure-9-LOXn detaillierter zu untersuchen und eine mögliche inverse Substratbindung bei diesen Enzymen zu bestätigen.

Die Modellierung der Struktur der humanen 5-LOX ergab keinerlei Hinweise auf geladene Gruppen im Bereich der Bindungstasche (Browner et al., 1998). Demzufolge wäre das Eintauchen der Carboxylgruppe in die hydrophobe Tasche wie oben bereits diskutiert nur durch Überwindung einer Energiebarriere möglich, was zu einer stark reduzierten Substrataffinität führen müsste. Die kinetischen Konstanten K_M und V_{max} der 5- bzw. 15-LOX katalysierten Arachidonsäureoxygenierung sind jedoch vergleichbar (Aharony und Stein, 1986).

4.2.4 Zusammenfassung der Erkenntnisse über die Substratbindung bei Lipoxygenasen

Zusammenfassend lässt sich aus den experimentellen Ergebnissen folgendes über die Substratbindung bei LOXn ableiten:

Die Orientierung der Arachidonsäure im aktiven Zentrum ist für die untersuchten Enzyme (Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX, humane 5-LOX) konserviert, das heißt die Fettsäure wird mit dem Methylenende in der Enzymtasche gebunden. Die humane 5-LOX ist nicht in der Lage, Substrate invers zu binden, bzw. invers gebundene Substrate zu oxygenieren. Diese Ergebnisse unterstützen die Volumen-Hypothese (Abb. 8a). Demgegenüber kann bei der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX eine inverse Substratbindung erzwungen werden. Hierzu ist aber eine gleichzeitige Modifizierung beider Enden der Substratfettsäure nötig, also die Methylierung der Carboxylgruppe und die Einführung polarer oder sterisch anspruchsvoller Gruppen am Methylenende. Die dann durch das Enzym katalysierte Reaktion ist eine 5-Lipoxygenierung, obwohl strukturell auch 15-Lipoxygenierung möglich wäre.

Die hier ermittelten Versuchsergebnisse liefern indirekte Hinweise auf die Substratbindung. Der letztendliche Beweis kann nur über die direkte Untersuchung der Struktur von Enzym-Substrat-Komplexen erfolgen. Da hierfür strikt anaerobe Bedingungen notwendig sind, um eine Reaktion zu verhindern, ist ein solches Experiment nur schwer durchzuführen. Am ehesten könnte dies durch Versuche im Weltraum geschehen. Alternativ könnten inaktive Enzymmutanten untersucht werden. Allerdings kann man bei inaktiven Enzymspezies nie mit Sicherheit sagen, dass keine strukturellen Veränderungen stattgefunden haben. Deshalb wäre der Schluß auf die Verhältnisse bei nativen Enzymen nur bedingt zulässig.

Es ist zu betonen, dass diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf andere LOX-Isoformen übertragbar sind. Es ist durchaus denkbar, dass die Bindungsverhältnisse bei anderen LOXn, insbesondere bei den pflanzlichen Enzymen, unterschiedlich sind. Für die Aufklärung der Substratbindung bei diesen Enzymen wären analoge Experimente notwendig.

4.3 Hemmung durch Ebselen und pharmakologische Relevanz

Die selenoorganische Verbindung Ebselen ist ein starker Inhibitor von tierischen LOXn. Für die katalytisch inaktive Fe[II]-LOX wurde eine annähernd vollständige Hemmung bereits im submikromolaren Bereich gefunden. Demgegenüber waren weitere häufig genutzte LOX-Inhibitoren, darunter der anti-atherosklerotisch wirkende LOX-Hemmstoff PD 146 176 (Sendobry et al., 1997), unter identischen experimentellen Bedingungen weit weniger effektiv.

4.3.1 Hemmmechanismen von Ebselen für die Lipoxygenase im Grundzustand und für die katalytisch aktive Form

Durch Untersuchung des Hemmmechanismus konnte gezeigt werden, dass die Fe[II]-LOX durch Ebselen irreversibel gehemmt wird und diese Hemmung einem nicht-kompetitiven Mechanismus folgt. Dem liegen folgende zwei Vorgänge zu Grunde: Ebselen bindet kovalent an das Enzym. Diese Bindung wurde bei nachträglicher Zugabe von SH-Komponenten wie Glutathion oder Merkaptoethanol aufgehoben, jedoch nur unvollständig und ohne Wiederherstellung der LOX-Aktivität. Darüber hinaus wurde die Eisenligandensphäre verändert, was durch Röntgenabsorptionsspektroskopie gezeigt wurde. Dies könnte durch eine Komplexierung des katalytisch aktiven Eisens erklärt werden, wobei Ebselen ein Wassermolekül als sechsten Eisenliganden verdrängt. Die Auswertung der EXAFS-Spektren unterstützt diese Annahme. Es wurde eine gute Übereinstimmung von experimentellem und theoretischem Kurvenverlauf für den LOX-Ebselen-Komplex erzielt (Abb. 27). Für einen solchen Ebselen-Eisen-Komplex ist es notwendig, dass Ebselen in die Substratbindungstasche gelangt. Da es sterisch anspruchsvoller und weniger flexibel ist als die Substrat-Fettsäuren, wurde untersucht, ob es in die Bindungstasche passt, ohne dass größere Veränderungen in der Enzymstruktur notwendig sind. Die durchgeführten molekularen Modellierungen des Enzym-Ebselen-Komplexes basierend auf der Raumstruktur der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX ergaben keine sterischen Hindernisse, die eine Bindung des Ebselens in der Nähe des Eisens verhindert hätten.

Leider ist es nicht möglich, aus den experimentellen Daten zu schließen, welcher Teil der Hemmung durch Ebselen auf die kovalente Bindung bzw. auf die Eisenkomplexierung zurückgeht. Ein Ansatz, um dieses Problem zu untersuchen, wäre der Austausch aller in der LOX enthaltenen Cysteine in Aminosäuren, an die Ebselen nicht binden kann. Der experimentelle Aufwand hierfür wäre aber sehr hoch und die Wahrscheinlichkeit, dass eine

solche Enzymmutante katalytisch nicht mehr aktiv ist, groß.

Im Gegensatz zur Fe[II]-LOX ist die aktive Form (Fe[III]-LOX) weniger gut durch Ebselen hemmbar. Die benötigten Konzentrationen sind deutlich höher und die Hemmung folgt nur einem kompetitiven Mechanismus. Für beide Formen der Inhibition wurde keine Zeitabhängigkeit festgestellt. Die Hemmung erfolgte sofort, allerdings wurden keine stop-flow-Experimente durchgeführt, um den Millisekunden-Bereich zu untersuchen.

4.3.2 Bedeutung der Ergebnisse für einen Einsatz von Ebselen als LOX-Inhibitor *in vivo*

Um die Möglichkeiten des Ebselens als LOX-Hemmstoff *in vivo* abschätzen zu können, gilt es folgendes zu bedenken. Die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Hemmpotentiale von Ebselen für die Fe[II]-LOX und die aktive Fe[III]-LOX unterschiedlich sind (nM gegenüber unterer μM Bereich). Demzufolge hängt auch die Hemmbarkeit der LOX *in vivo* vom Aktivitätszustand des Enzyms ab. Für die humane 5-LOX wurde beispielsweise berichtet, dass dieses Enzym erst nach Zellaktivierung katalytisch aktiv wird (Murakami et al., 1995). Studien mit Ratten, die 30 mg Ebselen pro kg Körpergewicht verabreicht bekamen, zeigten, dass die Plasma-Selen-Konzentration um 4 μM anstieg (Takasago et al., 1997). Diese Konzentration liegt im Bereich von K_i der aktiven Fe[III]-LOX und somit weit oberhalb der benötigten Hemmstoffkonzentration für die Fe[II]-LOX, so dass beide Enzymzustände hemmbar wären. Aus diesen Daten würde sich also ergeben, dass Ebselen auch *in vivo* als potenter LOX-Hemmstoff einsetzbar ist. Sogar die aktive Fe[III]-LOX ist durch die erreichbaren Plasmakonzentrationen hemmbar.

Darüber hinaus gilt es jedoch einen weiteren Punkt zu beachten. Tierische Zellen enthalten normalerweise hohe Konzentrationen an reduziertem Glutathion. Die Gegenwart von SH-Reagenzien verhindert jedoch eine effektive LOX-Hemmung durch Ebselen. So sinkt der IC_{50} -Wert in Gegenwart von 1 mM Glutathion von 200 nM auf 300 μM (Schewe et al., 1994). Demgegenüber gibt es kaum Glutathion im extrazellulären Bereich, wodurch eine LOX-Hemmung nicht beeinflusst würde. Unter normalen Bedingungen sind LOXn intrazelluläre Enzyme, im Bereich von Entzündungen oder fortschreitenden atherosklerotischen Läsionen tritt jedoch verstärkt eine Zellzerstörung auf. Dadurch können LOXn in den extrazellulären Bereich gelangen, wo sie durch Lipidperoxidation zum Voranschreiten von Krankheiten beitragen können. Die selektive Hemmung dieser extrazellulären LOXn ohne die wesentliche Beeinflussung der intrazellulären LOX-Aktivität könnte eine pharmakologisch interessante Wirkung darstellen.

4.4 Trunkationsexperimente und Membranbindung der LOX

4.4.1 Trunkation der Lipoxygenase

Aus den bekannten LOX-Kristallstrukturen geht hervor, dass sowohl pflanzliche als auch tierische LOXn aus zwei Domänen bestehen. Es existiert eine kleinere β -Faltblatt-Domäne am N-Terminus und eine große, helikal aufgebaute C-terminale Domäne. Letztere enthält das aktive Zentrum des Enzyms mit der Substratbindungstasche und dem katalytisch aktiven Nichthämeisen. Sie kann daher als katalytische Untereinheit angesehen werden. Obwohl der N-Terminus keinen bekannten Einfluss auf die Enzymaktivität hat, scheiterten frühere Versuche, eine katalytisch aktive Trunktationsmutante (ohne die N-terminale Domäne) zu exprimieren. Allerdings muss man bedenken, dass eine N-terminale Trunkation immer mit einem hohen Risiko der falschen Faltung von Proteinen einhergeht, da Proteine ausgehend vom N-Terminus synthetisiert werden. In dieser Arbeit wurde ein erneuter Versuch unternommen, eine aktive Trunktationsmutante herzustellen. Dabei wurde in Betracht gezogen, dass die für den His-tag angehängten Aminosäuren das Risiko der Misfaltung möglicherweise verringern. Es stellte sich heraus, dass die so exprimierte Trunktationsmutante, die in der LOX-Sequenz mit Gly115 startete, enzymatisch aktiv ist. Außer einer etwa sechsfach geringeren Aktivität weist sie ähnliche enzymatische Eigenschaften auf, wie das WT-Enzym. Dies ist das erste Mal, dass gezeigt wurde, dass die N-terminale β -Faltblatt-Domäne für die Enzymaktivität tierischer LOXn nicht essentiell ist und dass die meisten wichtigen enzymatischen Eigenschaften in der Trunktationsmutante erhalten bleiben. Ähnliche Ergebnisse ergaben kürzlich Studien an der Soja-LOX-1 (Maccarrone et al., 2001). Hier lieferte ein anderer Ansatz, nämlich proteolytischer Verdau des Enzyms, eine katalytisch aktive 'Mini-LOX', die ebenfalls nur die C-terminale Domäne enthielt.

4.4.2 Bedeutung der N-terminalen Domäne für die Membranbindung

Strukturvergleiche zeigten eine Ähnlichkeit der N-terminalen LOX- β -Faltblatt-Domäne mit der C-terminalen Domäne der humanen Pankreas-Lipase (Gillmor et al., 1997). Da für dieses Enzym gezeigt wurde, dass die β -Faltblatt-Domäne für die Bindung an Membranen verantwortlich ist, wurde die gleiche Funktion für die 15-LOX postuliert, jedoch nicht experimentell untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Membranbindungsstudien und -oxygenierungsversuche mit der Trunktationsmutante zeigten zwar eine deutlich geringere aber nach wie vor vorhandene Membranbindungsfähigkeit. Die N-terminale

β -Faltblatt-Domäne ist also nicht essentiell für die Membranbindung der 15-LOX, sie scheint jedoch eine wesentliche Rolle zu spielen. Um diesen Prozess genauer zu untersuchen, wurden Punktmutationen eingeführt, wobei oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren in geladene Reste ausgetauscht wurden. Zunächst wurden Phe70 und Leu71 der N-terminalen Domäne untersucht. Diese beiden Aminosäuren wurden ausgehend von einem Sequenzvergleich als die den Bindungsdeterminanten der Lipase entsprechenden vorgeschlagen (Gillmor et al., 1997). Die Mutation in geladene Aminosäuren mit ähnlichen sterischen Eigenschaften verringerte die Membranbindungsfähigkeit der 15-LOX, was für eine Beteiligung an diesem Vorgang spricht. Darüber hinaus konnte eine weitere Bindungsdeterminante in der N-terminalen Domäne identifiziert werden, das Tyr15.

4.4.3 Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Membranbindung

Da die Trunktationsmutante noch an Membranen zu binden vermochte, wurden auch in der C-terminalen Domäne Bindungsdeterminanten vermutet. Die Suche nach entsprechenden oberflächenexponierten, hydrophoben Aminosäuren, die in der Nähe des Eingangs zum aktiven Zentrum liegen, wurde durch die Unvollständigkeit der Kristallstruktur der 15-LOX erschwert. Nach dem Hineinmodellieren fehlender Reste konnten verschiedene Aminosäuren mit den entsprechenden Eigenschaften identifiziert werden. Einige hiervon wurden in ein geladenes Glutamat ausgetauscht und die verbliebene Membranbindungsfähigkeit untersucht. So konnten auch in der C-terminalen Domäne Aminosäuren identifiziert werden, die einen starken Einfluss auf die Membranbindung haben (W181, L195).

Versuche zur Oxygenierung von Biomembranen durch diese LOX-Mutanten zeigten, dass auch die Membranoxygenaseaktivität abnimmt. Darüber hinaus waren Mehrfachmutanten mit nur noch geringer Membranbindungsfähigkeit kaum noch in der Lage, entsprechend dem Wildtyp Modellmembranen (EKRM) zu permeabilisieren und luminal Proteine freizusetzen, wie am Beispiel der PDI untersucht wurde.

4.4.4 Zusammenfassung der Erkenntnisse zur Membranbindung der 15-LOX und Vergleich mit Ergebnissen zu anderen Lipoxygenasen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX durch hydrophobe Wechselwirkungen an Biomembranen bindet. Dieser Prozess wird vermittelt durch oberflächenexponierte, hydrophobe Aminosäuren, die sowohl in der N-terminalen,

als auch in der C-terminalen Domäne lokalisiert sind. Einhergehend mit der verringerten Membranbindungsfähigkeit nach einem Austausch kritischer Aminosäuren ist eine verminderte Membranoxygenaseaktivität. Dies ist übereinstimmend mit der Tatsache, dass ein Umsatz von in Biomembranen veresterten Substrat-Fettsäuren die Bindung des Enzyms an die Membran erfordert.

Andere LOX-Isoformen sind ebenfalls in der Lage, an Membranen zu binden. Für die humane 5-LOX wurde die N-terminale Domäne als verantwortlich für die Membranbindung vorgeschlagen (Kulkarni et al., 2002). Versuche mit nur dieser Domäne deuteten auf drei Tryptophane als Bindungsdeterminanten hin: Trp13, Trp75 und Trp102 (Kulkarni et al., 2002). Leider wurden keine Versuche mit dem vollständigen Enzym durchgeführt. Vergleicht man die identifizierten Tryptophane mit den entsprechenden Resten der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX (Ile14, Leu71, Trp100), so kann man schließen, dass zwei der drei Reste (Trp13 und Trp102) in dem Bereich zwischen den beiden Domänen liegen und somit zumindest beim Kaninchen-Enzym keine Rolle bei Membranwechselwirkungen spielen sollten. Allerdings wurde beim Kaninchen-Enzym das dem Ile14 direkt benachbarte Tyr15 als Bindungsdeterminante identifiziert. Das dritte Tryptophan (Trp75) entspricht dem bei der Kaninchen-LOX hier als Membranbindungsdeterminante bestimmten Leu71.

Auch für die Gurken-Linolsäure-13-LOX gilt die N-terminale Domäne als verantwortlich für die Membranbindung (May et al., 2000). Demgegenüber führte die proteolytische Trunkation der N-terminalen Domäne bei der Soja-LOX-1 zu einer erhöhten Membranbindungsfähigkeit (Maccarrone et al., 2001), d.h. diese Domäne kann auch zu einer verminderten Membranbindungskapazität führen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich, dass für eine optimale Membranbindung bei der Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX beide, die N-terminale β -Faltblatt-Domäne und die C-terminale katalytische Domäne, verantwortlich sind. Demzufolge kann der Beitrag der N-terminalen Domäne an der Membranbindung variieren und scheint von der LOX-Isoform abzuhängen.

5 Literaturverzeichnis

- Aharony, D. und Stein, R. L. (1986): Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase, *J Biol Chem* 261 [25], Seite 11512-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3091590
- Anderson, K. M.; Seed, T.; Meng, J.; Ou, D.; Alrefai, W. A. und Harris, J. E. (1998): Five-lipoxygenase inhibitors reduce Panc-1 survival: the mode of cell death and synergism of MK886 with gamma linolenic acid, *Anticancer Res* 18 [2A], Seite 791-800. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9615721
- Andre, E. und Hou, K.W. (1932): The presence of a lipid oxidase in soybean Glycine soya., *Acad Sci* 194, Seite 645-647.
- Anton, R. und Vila, L. (2000): Stereoselective biosynthesis of hepoxilin B3 in human epidermis, *J Invest Dermatol* 114 [3], Seite 554-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10692117
- Avis, I.; Hong, S. H.; Martinez, A.; Moody, T.; Choi, Y. H.; Trepel, J.; Das, R.; Jett, M. und Mulshine, J. L. (2001): Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions, *Faseb J* 15 [11], Seite 2007-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11511519
- Belkner, J.; Stender, H.; Holzhutter, H. G.; Holm, C. und Kuhn, H. (2000): Macrophage cholesteryl ester hydrolases and hormone-sensitive lipase prefer specifically oxidized cholesteryl esters as substrates over their non-oxidized counterparts, *Biochem J* 352 Pt 1, Seite 125-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11062065
- Belkner, J.; Stender, H. und Kuhn, H. (1998): The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E, *J Biol Chem* 273 [36], Seite 23225-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9722553
- Belkner, J.; Wiesner, R.; Rathman, J.; Barnett, J.; Sigal, E. und Kuhn, H. (1993): Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases, *Eur J Biochem* 213 [1], Seite 251-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8477699
- Benz, D. J.; Mol, M.; Ezaki, M.; Mori-Ito, N.; Zelan, I.; Miyanohara, A.; Friedmann, T.; Parthasarathy, S.; Steinberg, D. und Witztum, J. L. (1995): Enhanced levels of lipoperoxides in low density lipoprotein incubated with murine fibroblast expressing high levels of human 15-lipoxygenase, *J Biol Chem* 270 [10], Seite 5191-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7890629
- Berger, M.; Schwarz, K.; Thiele, H.; Reimann, I.; Huth, A.; Borngraber, S.; Kuhn, H. und Thiele, B. J. (1998): Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase

- and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits, *J Mol Biol* 278 [5], Seite 935-48. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9600854
- Bisakowski, B.; Perraud, X. und Kermasha, S. (1997): Characterization of hydroperoxides and carbonyl compounds obtained by lipoxygenase extracts of selected microorganisms, *Biosci Biotechnol Biochem* 61 [8], Seite 1262-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9301105
- Bligh, E.G. und Dyer, W.J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification., *Canad J Biochem Physiol* 37, Seite 911-917.
- Bocan, T. M.; Rosebury, W. S.; Mueller, S. B.; Kuchera, S.; Welch, K.; Daugherty, A. und Cornicelli, J. A. (1998): A specific 15-lipoxygenase inhibitor limits the progression and monocyte-macrophage enrichment of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the rabbit, *Atherosclerosis* 136 [2], Seite 203-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9543090
- Boeglin, W. E.; Kim, R. B. und Brash, A. R. (1998): A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [12], Seite 6744-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9618483
- Borgeat, P.; Hamberg, M. und Samuelsson, B. (1976): Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases, *J Biol Chem* 251 [24], Seite 7816-20. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=826538
- Borngraber, S. (1996): Untersuchungen zur ortsgerichteten Mutagenese und zur Expression der Kaninchen 15-Lipoxygenase., Dissertation, Institut für Biologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Borngraber, S.; Browner, M.; Gillmor, S.; Gerth, C.; Anton, M.; Fletterick, R. und Kuhn, H. (1999): Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity, *J Biol Chem* 274 [52], Seite 37345-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10601303
- Borngraber, S.; Kuban, R. J.; Anton, M. und Kuhn, H. (1996): Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases, *J Mol Biol* 264 [5], Seite 1145-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9000636
- Bortuzzo, C.; Hanif, R.; Kashfi, K.; Staiano-Coico, L.; Shiff, S. J. und Rigas, B. (1996): The effect of leukotrienes B and selected HETEs on the proliferation of colon cancer cells, *Biochim Biophys Acta* 1300 [3], Seite 240-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8679690
- Boyd, D.H. und Adams, G.A. (1955): An assay method for lipoxydase in animal tissue., *Can J Physiol* 23, Seite 191-198.

- Boyington, J. C.; Gaffney, B. J. und Amzel, L. M. (1993): The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase, *Science* 260 [5113], Seite 1482-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8502991
- Brash, A. R. (1999): Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J Biol Chem* 274 [34], Seite 23679-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10446122
- Brash, A. R.; Boeglin, W. E. und Chang, M. S. (1997): Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [12], Seite 6148-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9177185
- Brash, A. R.; Boeglin, W. E.; Chang, M. S. und Shieh, B. H. (1996): Purification and molecular cloning of an 8R-lipoxygenase from the coral *Plexaura homomalla* reveal the related primary structures of R- and S-lipoxygenases, *J Biol Chem* 271 [34], Seite 20949-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8702854
- Brash, A. R.; Hughes, M. A.; Hawkins, D. J.; Boeglin, W. E.; Song, W. C. und Meijer, L. (1991): Allene oxide and aldehyde biosynthesis in starfish oocytes, *J Biol Chem* 266 [34], Seite 22926-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1744085
- Brinckmann, R.; Schnurr, K.; Heydeck, D.; Rosenbach, T.; Kolde, G. und Kuhn, H. (1998): Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme, *Blood* 91 [1], Seite 64-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9414270
- Brinckmann, R.; Topp, M. S.; Zalan, I.; Heydeck, D.; Ludwig, P.; Kuhn, H.; Berdel, W. E. und Habenicht, J. R. (1996): Regulation of 15-lipoxygenase expression in lung epithelial cells by interleukin-4, *Biochem J* 318 (Pt 1), Seite 305-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8761486
- Brock, T. G.; Paine, R., 3rd und Peters-Golden, M. (1994): Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells, *J Biol Chem* 269 [35], Seite 22059-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8071328
- Browner, M.; Gillmor, S.A. und Fletterick, R. (1998): Burying a charge, *Nat Struct Biol* 5, Seite 179.
- Bryant, R. W.; Bailey, J. M.; Schewe, T. und Rapoport, S. M. (1982): Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid, *J Biol Chem* 257 [11], Seite 6050-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6804460
- Bryant, R. W.; Schewe, T.; Rapoport, S. M. und Bailey, J. M. (1985): Leukotriene formation by a purified reticulocyte lipoxygenase enzyme. Conversion of arachidonic acid and 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid to 14, 15-leukotriene A₄, *J Biol Chem* 260 [6], Seite 3548-55. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2982864
- Buchanan, M. R.; Horsewood, P. und Brister, S. J. (1998): Regulation of endothelial cell and platelet receptor-ligand binding by the 12- and 15-lipoxygenase monohydroxides, 12-, 15-HETE and 13-HODE, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 58 [5], Seite 339-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9690711
- Cao, Y.; Pearman, A. T.; Zimmerman, G. A.; McIntyre, T. M. und Prescott, S. M. (2000): Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis, Proc Natl Acad Sci U S A 97 [21], Seite 11280-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11005842
- Celotti, F. und Laufer, S. (2001): Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept, Pharmacol Res 43 [5], Seite 429-36. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11394934
- Chaitidis, P.; Schewe, T.; Sutherland, M.; Kuhn, H. und Nigam, S. (1998): 15-Lipoxygenation of phospholipids may precede the sn-2 cleavage by phospholipases A2: reaction specificities of secretory and cytosolic phospholipases A2 towards native and 15-lipoxygenated arachidonoyl phospholipids, FEBS Lett 434 [3], Seite 437-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9742970
- Chan, C. C.; Duhamel, L. und Ford-Hutchison, A. (1985): Leukotriene B4 and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulate epidermal proliferation in vivo in the guinea pig, J Invest Dermatol 85 [4], Seite 333-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2995499
- Chen, C. R.; Voelkel, N. F. und Chang, S. W. (1994): Platelet-activating factor potentiates protamine-induced lung edema. Role of eicosanoids, Am J Respir Crit Care Med 149 [1], Seite 34-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8111595
- Chen, X. S. und Funk, C. D. (1993): Structure-function properties of human platelet 12-lipoxygenase: chimeric enzyme and in vitro mutagenesis studies, Faseb J 7 [8], Seite 694-701. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8500694
- Chen, X. S.; Kurre, U.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G. und Funk, C. D. (1994): cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases, J Biol Chem 269 [19], Seite 13979-87. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8188678
- Chen, X. S.; Sheller, J. R.; Johnson, E. N. und Funk, C. D. (1994): Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene, Nature 372 [6502], Seite 179-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8188678

[=Citation&list_uids=7969451](#)

- Chen, Y. Q.; Duniec, Z. M.; Liu, B.; Hagmann, W.; Gao, X.; Shimoji, K.; Marnett, L. J.; Johnson, C. R. und Honn, K. V. (1994): Endogenous 12(S)-HETE production by tumor cells and its role in metastasis, *Cancer Res* 54 [6], Seite 1574-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7511046
- Claeys, M.; Kivits, G. A.; Christ-Hazelhof, E. und Nugteren, D. H. (1985): Metabolic profile of linoleic acid in porcine leukocytes through the lipoxygenase pathway, *Biochim Biophys Acta* 837 [1], Seite 35-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2996610
- Connolly, J. M. und Rose, D. P. (1998): Enhanced angiogenesis and growth of 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cells in athymic nude mice, *Cancer Lett* 132 [1-2], Seite 107-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10397460
- Conrad, D. J.; Kuhn, H.; Mulkins, M.; Highland, E. und Sigal, E. (1992): Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [1], Seite 217-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1729692
- Conrad, D. J. und Lu, M. (2000): Regulation of human 12/15-lipoxygenase by Stat6-dependent transcription, *Am J Respir Cell Mol Biol* 22 [2], Seite 226-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10657944
- Conradson, S. D.; Burgess, B. K.; Newton, W. E.; Di Cicco, A.; Filipponi, A.; Wu, Z. Y.; Natoli, C. R.; Hedman, B. und Hodgson, K. O. (1994): Selenol binds to iron in nitrogenase iron-molybdenum cofactor: an extended x-ray absorption fine structure study, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 [4], Seite 1290-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8108404
- Cotgreave, I. A.; Duddy, S. K.; Kass, G. E.; Thompson, D. und Moldeus, P. (1989): Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C?, *Biochem Pharmacol* 38 [4], Seite 649-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2537084
- Cotgreave, I. A.; Johansson, U.; Westergren, G.; Moldeus, P. W. und Brattsand, R. (1988): The anti-inflammatory activity of Ebselen but not thiols in experimental alveolitis and bronchiolitis, *Agents Actions* 24 [3-4], Seite 313-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2459936
- Crane, F.L.; Glenn, J.L. und Green, D.E. (1956): Studies on the electron transfer system. The electron transfer particle., *Biochim Biophys Acta* 22, Seite 475-487.
- Cyrus, T.; Witztum, J. L.; Rader, D. J.; Tangirala, R.; Fazio, S.; Linton, M. F. und Funk, C. D. (1999): Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice, *J Clin Invest* 103 [11], Seite 1597-604. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10359569

- Datta, K.; Biswal, S. S. und Kehrer, J. P. (1999): The 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitor, MK886, induces apoptosis independently of FLAP, *Biochem J* 340 (Pt 2), Seite 371-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10333477
- de Groot, J. J.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F.; Boldingh, J.; Wever, R. und van Gelder, B. F. (1975): Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1, *Biochim Biophys Acta* 377 [1], Seite 71-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=164225
- De Marzo, N.; Sloane, D. L.; Dicharry, S.; Highland, E. und Sigal, E. (1992): Cloning and expression of an airway epithelial 12-lipoxygenase, *Am J Physiol* 263 [1 Pt 1], Seite 1 p preceding L1. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1636733
- Desplat, V.; Dulery, C.; Praloran, V. und Denizot, Y. (1999): Incorporation and effect of arachidonic acid on the growth of human myeloma cell lines, *Mediators Inflamm* 8 [2], Seite 115-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10704149
- Ding, X. Z.; Iversen, P.; Cluck, M. W.; Knezetic, J. A. und Adrian, T. E. (1999): Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 261 [1], Seite 218-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10405349
- Ding, X. Z.; Kuszynski, C. A.; El-Metwally, T. H. und Adrian, T. E. (1999): Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 266 [2], Seite 392-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10600514
- Dixon, R. A.; Diehl, R. E.; Opas, E.; Rands, E.; Vickers, P. J.; Evans, J. F.; Gillard, J. W. und Miller, D. K. (1990): Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis, *Nature* 343 [6255], Seite 282-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2300173
- Dubiel, W.; Muller, M.; Rathmann, J.; Hiebsch, C. und Rapoport, S. M. (1981): Determination and characteristics of energy-dependent proteolysis in rabbit reticulocytes, *Acta Biol Med Ger* 40 [4-5], Seite 625-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7315109
- Dunham, W. R.; Carroll, R. T.; Thompson, J. F.; Sands, R. H. und Funk, M. O., Jr. (1990): The initial characterization of the iron environment in lipoxygenase by Mossbauer spectroscopy, *Eur J Biochem* 190 [3], Seite 611-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2164931
- Edenius, C.; Kumlin, M.; Bjork, T.; Anggard, A. und Lindgren, J. A. (1990): Lipoxin formation in human nasal polyps and bronchial tissue, *FEBS Lett* 272 [1-2], Seite 25-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2164931

[=Citation&list_uids=2172016](#)

- Edenius, C.; Stenke, L. und Lindgren, J. A. (1991): On the mechanism of transcellular lipoxin formation in human platelets and granulocytes, *Eur J Biochem* 199 [2], Seite 401-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1906402
- Egmond, M. R.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. und Boldingh, J. (1973): C-11 H-abstraction from linoleic acid, the rate-limiting step in lipoxygenase catalysis, *Biochem Biophys Res Commun* 54 [3], Seite 1178-84. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4796268
- Fierro, I. M. und Serhan, C. N. (2001): Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins, *Braz J Med Biol Res* 34 [5], Seite 555-66. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11323741
- Fiorucci, S.; Meli, R.; Bucci, M. und Cirino, G. (2001): Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?, *Biochem Pharmacol* 62 [11], Seite 1433-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11728379
- Fischer, D. B.; Christman, J. W. und Badr, K. F. (1992): Fifteen-S-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-S-HETE) specifically antagonizes the chemotactic action and glomerular synthesis of leukotriene B₄ in the rat, *Kidney Int* 41 [5], Seite 1155-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1319518
- Flatman, S.; Hurst, J. S.; McDonald-Gibson, R. G.; Jonas, G. E. und Slater, T. F. (1986): Biochemical studies on a 12-lipoxygenase in human uterine cervix, *Biochim Biophys Acta* 883 [1], Seite 7-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3089299
- Fleming, J.; Thiele, B. J.; Chester, J.; O'Prey, J.; Janetzki, S.; Aitken, A.; Anton, I. A.; Rapoport, S. M. und Harrison, P. R. (1989): The complete sequence of the rabbit erythroid cell-specific 15-lipoxygenase mRNA: comparison of the predicted amino acid sequence of the erythrocyte lipoxygenase with other lipoxygenases, *Gene* 79 [1], Seite 181-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2777088
- Folcik, V. A.; Nivar-Aristy, R. A.; Krajewski, L. P. und Cathcart, M. K. (1995): Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques, *J Clin Invest* 96 [1], Seite 504-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7615823
- Funk, C. D. (1993): Molecular biology in the eicosanoid field, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 45, Seite 67-98. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8341804
- Funk, C. D.; Chen, X. S.; Johnson, E. N. und Zhao, L. (2002): Lipoxygenase genes and their targeted disruption, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, Seite 303-12. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432925
- Funk, C. D.; Furci, L. und FitzGerald, G. A. (1990): Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythroleukemia cell 12-lipoxygenase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [15], Seite 5638-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2377602
- Funk, C. D. und Loll, P. J. (1997): A molecular dipstick?, *Nat Struct Biol* 4 [12], Seite 966-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9406540
- Furstenberger, G.; Marks, F. und Krieg, P. (2002): Arachidonate 8(S)-lipoxygenase, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, Seite 235-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432921
- Gan, Q. F.; Browner, M. F.; Sloane, D. L. und Sigal, E. (1996): Defining the arachidonic acid binding site of human 15-lipoxygenase. Molecular modeling and mutagenesis, *J Biol Chem* 271 [41], Seite 25412-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8810309
- Gan, Q. F.; Witkop, G. L.; Sloane, D. L.; Straub, K. M. und Sigal, E. (1995): Identification of a specific methionine in mammalian 15-lipoxygenase which is oxygenated by the enzyme product 13-HPODE: dissociation of sulfoxide formation from self-inactivation, *Biochemistry* 34 [21], Seite 7069-79. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7766617
- Gao, J. X. und Issekutz, A. C. (1993): The effect of ebselen on polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte migration to inflammatory reactions in rats, *Immunopharmacology* 25 [3], Seite 239-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8354640
- Gao, X.; Grignon, D. J.; Chbihi, T.; Zacharek, A.; Chen, Y. Q.; Sakr, W.; Porter, A. T.; Crissman, J. D.; Pontes, J. E.; Powell, I. J. und et al. (1995): Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer, *Urology* 46 [2], Seite 227-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7624992
- George, J.; Afek, A.; Shaish, A.; Levkovitz, H.; Bloom, N.; Cyrus, T.; Zhao, L.; Funk, C. D.; Sigal, E. und Harats, D. (2001): 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice, *Circulation* 104 [14], Seite 1646-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11581143
- Ghosh, J. und Myers, C. E. (1998): Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [22], Seite 13182-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9789062
- Gillmor, S. A.; Villasenor, A.; Fletterick, R.; Sigal, E. und Browner, M. F. (1997): The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the

- determinants of substrate specificity, *Nat Struct Biol* 4 [12], Seite 1003-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9406550
- Goldyne, M. E.; Burrish, G. F.; Poubelle, P. und Borgeat, P. (1984): Arachidonic acid metabolism among human mononuclear leukocytes. Lipoxygenase-related pathways, *J Biol Chem* 259 [14], Seite 8815-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6430891
- Grechkin, A. (1998): Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway, *Prog Lipid Res* 37 [5], Seite 317-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10209652
- Grulich, C.; Duvoisin, R. M.; Wiedmann, M. und van Leyen, K. (2001): Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte, *FEBS Lett* 489 [1], Seite 51-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11231012
- Gu, J.; Liu, Y.; Wen, Y.; Natarajan, R.; Lanting, L. und Nadler, J. L. (2001): Evidence that increased 12-lipoxygenase activity induces apoptosis in fibroblasts, *J Cell Physiol* 186 [3], Seite 357-65. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11169974
- Guex, N. und Peitsch, M.C. (1997): SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb-Viewer: An environment for comparative protein modeling., *Electrophoresis* 18, Seite 2714-2723.
- Gupta, S.; Srivastava, M.; Ahmad, N.; Sakamoto, K.; Bostwick, D. G. und Mukhtar, H. (2001): Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma, *Cancer* 91 [4], Seite 737-43. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11241241
- Hada, T.; Hagiya, H.; Suzuki, H.; Arakawa, T.; Nakamura, M.; Matsuda, S.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Azekawa, T.; Morita, Y. und et al. (1994): Arachidonate 12-lipoxygenase of rat pineal glands: catalytic properties and primary structure deduced from its cDNA, *Biochim Biophys Acta* 1211 [2], Seite 221-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8117750
- Hada, T.; Swift, L. L. und Brash, A. R. (1997): Discovery of 5R-lipoxygenase activity in oocytes of the surf clam, *Spisula solidissima*, *Biochim Biophys Acta* 1346 [2], Seite 109-19. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9219894
- Hada, T.; Ueda, N.; Takahashi, Y. und Yamamoto, S. (1991): Catalytic properties of human platelet 12-lipoxygenase as compared with the enzymes of other origins, *Biochim Biophys Acta* 1083 [1], Seite 89-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1851637
- Hamberg, M. und Samuelsson, B. (1967): On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxygenase., *J Biol Chem* 242, Seite 5329-5335.

- Hamberg, M. und Samuelsson, B. (1974): Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets, *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 [9], Seite 3400-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4215079
- Harats, D.; Shaish, A.; George, J.; Mulkins, M.; Kurihara, H.; Levkovitz, H. und Sigal, E. (2000): Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 [9], Seite 2100-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10978255
- Hartel, B.; Ludwig, P.; Schewe, T. und Rapoport, S. M. (1982): Self-inactivation by 13-hydroperoxylinoic acid and lipohydroperoxidase activity of the reticulocyte lipoxygenase, *Eur J Biochem* 126 [2], Seite 353-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6813118
- Hattori, R.; Inoue, R.; Sase, K.; Eizawa, H.; Kosuga, K.; Aoyama, T.; Masayasu, H.; Kawai, C.; Sasayama, S. und Yui, Y. (1994): Preferential inhibition of inducible nitric oxide synthase by ebselen, *Eur J Pharmacol* 267 [2], Seite R1-2. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7519560
- Hawkins, D. J. und Brash, A. R. (1987): Eggs of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, contain a prominent (11R) and (12R) lipoxygenase activity, *J Biol Chem* 262 [16], Seite 7629-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3108255
- Henricks, P. A.; Engels, F.; van der Vliet, H. und Nijkamp, F. P. (1991): 9- and 13-hydroxy-linoleic acid possess chemotactic activity for bovine and human polymorphonuclear leukocytes, *Prostaglandins* 41 [1], Seite 21-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2020743
- Henriksen, T.; Mahoney, E. M. und Steinberg, D. (1981): Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 [10], Seite 6499-503. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6273873
- Henriksson, P.; Hamberg, M. und Diczfalussy, U. (1985): Formation of 15-HETE as a major hydroxyeicosatetraenoic acid in the atherosclerotic vessel wall, *Biochim Biophys Acta* 834 [2], Seite 272-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3995065
- Herlin, T.; Fogh, K.; Hansen, E. S.; Andreassen, A.; Knudsen, V.; Henriksen, T. B.; Bunger, C. und Kragballe, K. (1990): 15-HETE inhibits leukotriene B₄ formation and synovial cell proliferation in experimental arthritis, *Agents Actions* 29 [1-2], Seite 52-3. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2158220
- Herrmann, J. L.; Menter, D. G.; Beham, A.; von Eschenbach, A. und McDonnell, T. J. (1997): Regulation of lipid signaling pathways for cell survival and apoptosis by

- bcl-2 in prostate carcinoma cells, *Exp Cell Res* 234 [2], Seite 442-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9260915
- Heydeck, D.; Thomas, L.; Schnurr, K.; Trebus, F.; Thierfelder, W. E.; Ihle, J. N. und Kuhn, H. (1998): Interleukin-4 and -13 induce upregulation of the murine macrophage 12/15-lipoxygenase activity: evidence for the involvement of transcription factor STAT6, *Blood* 92 [7], Seite 2503-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9746791
- Higgs, G. A.; Salmon, J. A. und Spayne, J. A. (1981): The inflammatory effects of hydroperoxy and hydroxy acid products of arachidonate lipoxygenase in rabbit skin, *Br J Pharmacol* 74 [2], Seite 429-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6274465
- Honn, K. V.; Grossi, I. M.; Diglio, C. A.; Wojtukiewicz, M. und Taylor, J. D. (1989): Enhanced tumor cell adhesion to the subendothelial matrix resulting from 12(S)-HETE-induced endothelial cell retraction, *Faseb J* 3 [11], Seite 2285-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2673900
- Honn, K. V.; Tang, D. G.; Gao, X.; Butovich, I. A.; Liu, B.; Timar, J. und Hagmann, W. (1994): 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis, *Cancer Metastasis Rev* 13 [3-4], Seite 365-96. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7712597
- Hornung, E.; Walther, M.; Kuhn, H. und Feussner, I. (1999): Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [7], Seite 4192-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10097186
- Humphrey, W.; Dalke, A. und Schulten, K. (1996): VMD - Visual Molecular Dynamics, *J Molec Graphics* 14, Seite 33-38.
- Hunter, J. A.; Finkbeiner, W. E.; Nadel, J. A.; Goetzel, E. J. und Holtzman, M. J. (1985): Predominant generation of 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid by epithelial cells from human trachea, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [14], Seite 4633-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3927287
- Hussain, H.; Shornick, L. P.; Shannon, V. R.; Wilson, J. D.; Funk, C. D.; Pentland, A. P. und Holtzman, M. J. (1994): Epidermis contains platelet-type 12-lipoxygenase that is overexpressed in germinal layer keratinocytes in psoriasis, *Am J Physiol* 266 [1 Pt 1], Seite C243-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8304420
- Ikawa, H.; Kamitani, H.; Calvo, B. F.; Foley, J. F. und Eling, T. E. (1999): Expression of 15-lipoxygenase-1 in human colorectal cancer, *Cancer Res* 59 [2], Seite 360-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9927047
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome., *Nature* 409, Seite 860-921.

- Ishii, S.; Noguchi, M.; Miyano, M.; Matsumoto, T. und Noma, M. (1992): Mutagenesis studies on the amino acid residues involved in the iron-binding and the activity of human 5-lipoxygenase, *Biochem Biophys Res Commun* 184 [2], Seite 1133-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1575732
- Ivanov, I.; Groza, N.; Romanov, S.; Kuhn, H. und Myagkova, G. (2000): Total synthesis of the lipoxygenase substrates (5Z,8Z,11Z,14Z)-Nonadeca-5,8,11,14-tetraene-1,19-dioic acid and (5Z,8Z,11Z,14Z)-20,20-Dimethylheneicosa-5,8,11,14-tetraenoic acid., *Synthesis* 5, Seite 691-694.
- Janssen-Timmen, U.; Vickers, P. J.; Wittig, U.; Lehmann, W. D.; Stark, H. J.; Fusenig, N. E.; Rosenbach, T.; Radmark, O.; Samuelsson, B. und Habenicht, A. J. (1995): Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [15], Seite 6966-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7624354
- Jisaka, M.; Kim, R. B.; Boeglin, W. E. und Brash, A. R. (2000): Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2, *J Biol Chem* 275 [2], Seite 1287-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10625675
- Johnson, E. N.; Brass, L. F. und Funk, C. D. (1998): Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [6], Seite 3100-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9501222
- Kamitani, H.; Kameda, H.; Kelavkar, U. P. und Eling, T. E. (2000): A GATA binding site is involved in the regulation of 15-lipoxygenase-1 expression in human colorectal carcinoma cell line, caco-2, *FEBS Lett* 467 [2-3], Seite 341-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10675566
- Kamitani, H.; Taniura, S.; Ikawa, H.; Watanabe, T.; Kelavkar, U. P. und Eling, T. E. (2001): Expression of 15-lipoxygenase-1 is regulated by histone acetylation in human colorectal carcinoma, *Carcinogenesis* 22 [1], Seite 187-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11159758
- Kelavkar, U. P. und Badr, K. F. (1999): Effects of mutant p53 expression on human 15-lipoxygenase-promoter activity and murine 12/15-lipoxygenase gene expression: evidence that 15-lipoxygenase is a mutator gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [8], Seite 4378-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10200270
- Kelavkar, U. P.; Cohen, C.; Kamitani, H.; Eling, T. E. und Badr, K. F. (2000): Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging, *Carcinogenesis* 21 [10], Seite 1777-87. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11023533
- Kelavkar, U. P.; Nixon, J. B.; Cohen, C.; Dillehay, D.; Eling, T. E. und Badr, K. F. (2001): Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in PC-3 human prostate cancer cells in-

- creases tumorigenesis, *Carcinogenesis* 22 [11], Seite 1765-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11698337
- Kishimoto, K.; Nakamura, M.; Suzuki, H.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Takao, T.; Shimonishi, Y. und Tanabe, T. (1996): Suicide inactivation of porcine leukocyte 12-lipoxygenase associated with its incorporation of 15-hydroperoxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid derivative, *Biochim Biophys Acta* 1300 [1], Seite 56-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8608163
- Knapp, M. J. und Klinman, J. P. (2002): Environmentally coupled hydrogen tunneling, *Eur J Biochem* 269 [13], Seite 3113-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12084051
- Knapp, M. J.; Seebeck, F. P. und Klinman, J. P. (2001): Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1, *J Am Chem Soc* 123 [12], Seite 2931-2. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11457000
- Kozak, K. R.; Gupta, R. A.; Moody, J. S.; Ji, C.; Boeglin, W. E.; DuBois, R. N.; Brash, A. R. und Marnett, L. J. (2002): 15-Lipoxygenase Metabolism of 2-Arachidonylglycerol. GENERATION OF A PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR alpha AGONIST, *J Biol Chem* 277 [26], Seite 23278-86. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11956198
- Krieg, P.; Marks, F. und Furstenberger, G. (2001): A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression, *Genomics* 73 [3], Seite 323-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11350124
- Kroschwald, P.; Kroschwald, A.; Kuhn, H.; Ludwig, P.; Thiele, B. J.; Hohne, M.; Schewe, T. und Rapoport, S. M. (1989): Occurrence of the erythroid cell specific arachidonate 15-lipoxygenase in human reticulocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 160 [2], Seite 954-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2719708
- Kroschwald, P.; Kroschwald, A.; Wiesner, R.; Schewe, T. und Kuhn, H. (1986): The occurrence of a lipoxygenase pathway in reticulocytes of various species, *Biomed Biochim Acta* 45 [10], Seite 1237-47. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3105527
- Kuban, R. J.; Wiesner, R.; Rathman, J.; Veldink, G.; Nolting, H.; Sole, V. A. und Kuhn, H. (1998): The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases, *Biochem J* 332 (Pt 1), Seite 237-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9576873
- Kuhn, H.; Belkner, J. und Wiesner, R. (1990): Subcellular distribution of lipoxygenase products in rabbit reticulocyte membranes, *Eur J Biochem* 191 [1], Seite 221-7. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2116308
- Kuhn, H.; Belkner, J.; Zaiss, S.; Fahrenklempner, T. und Wohlfeil, S. (1994): Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis, *J Exp Med* 179 [6], Seite 1903-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8195716
- Kuhn, H. und Chan, L. (1997): The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis: pro- and antiatherogenic actions, *Curr Opin Lipidol* 8 [2], Seite 111-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9183549
- Kuhn, H.; Heydeck, D.; Hugou, I. und Gniwotta, C. (1997): In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis, *J Clin Invest* 99 [5], Seite 888-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9062346
- Kuhn, H.; Salzmann-Reinhardt, U.; Ludwig, P.; Ponicke, K.; Schewe, T. und Rapoport, S. (1986): The stoichiometry of oxygen uptake and conjugated diene formation during the dioxygenation of linoleic acid by the pure reticulocyte lipoxygenase. Evidence for aerobic hydroperoxidase activity, *Biochim Biophys Acta* 876 [2], Seite 187-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3006782
- Kuhn, H.; Schewe, T. und Rapoport, S. M. (1986): The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58, Seite 273-311. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3087142
- Kuhn, H.; Sprecher, H. und Brash, A. R. (1990): On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme, *J Biol Chem* 265 [27], Seite 16300-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2118902
- Kuhn, H. und Thiele, B. J. (1999): The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance, *FEBS Lett* 449 [1], Seite 7-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10225417
- Kuhn, H.; Thiele, B. J.; Ostareck-Lederer, A.; Stender, H.; Suzuki, H.; Yoshimoto, T. und Yamamoto, S. (1993): Bacterial expression, purification and partial characterization of recombinant rabbit reticulocyte 15-lipoxygenase, *Biochim Biophys Acta* 1168 [1], Seite 73-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8504145
- Kuhn, H.; Wiesner, R.; Alder, L.; Fitzsimmons, B. J.; Rokach, J. und Brash, A. R. (1987): Formation of lipoxin B by the pure reticulocyte lipoxygenase via sequential oxygenation of the substrate, *Eur J Biochem* 169 [3], Seite 593-601. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3121318

- Kulkarni, S.; Das, S.; Funk, C. D.; Murray, D. und Cho, W. (2002): Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase, *J Biol Chem* 277 [15], Seite 13167-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11796736
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* 227, Seite 680-685.
- Lee, T. H.; Horton, C. E.; Kyan-Aung, U.; Haskard, D.; Crea, A. E. und Spur, B. W. (1989): Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine, *Clin Sci (Lond)* 77 [2], Seite 195-203. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2548801
- Lehmann, W. D. (1994): Regio- and stereochemistry of the dioxygenation reaction catalyzed by (S)-type lipoxygenases or by the cyclooxygenase activity of prostaglandin H synthases, *Free Radic Biol Med* 16 [2], Seite 241-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8005520
- Lewis, R. A.; Austen, K. F. und Soberman, R. J. (1990): Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases, *N Engl J Med* 323 [10], Seite 645-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2166915
- Li, Q. J.; Bessems, J. G.; Commandeur, J. N.; Adams, B. und Vermeulen, N. P. (1994): Mechanism of protection of ebselen against paracetamol-induced toxicity in rat hepatocytes, *Biochem Pharmacol* 48 [8], Seite 1631-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7980628
- Lin, F. und Girotti, A. W. (1994): Cytoprotection against merocyanine 540-sensitized photoinactivation of the Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase in leukemia cells: glutathione and selenoperoxidase involvement, *Photochem Photobiol* 59 [3], Seite 320-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8016211
- Liu, B.; Maher, R. J.; Hannun, Y. A.; Porter, A. T. und Honn, K. V. (1994): 12(S)-HETE enhancement of prostate tumor cell invasion: selective role of PKC alpha, *J Natl Cancer Inst* 86 [15], Seite 1145-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7518003
- Liu, B.; Marnett, L. J.; Chaudhary, A.; Ji, C.; Blair, I. A.; Johnson, C. R.; Diglio, C. A. und Honn, K. V. (1994): Biosynthesis of 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid by B16 amelanotic melanoma cells is a determinant of their metastatic potential, *Lab Invest* 70 [3], Seite 314-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8145526
- Maas, R. L.; Brash, A. R. und Oates, J. A. (1982): Novel leukotrienes and lipoxygenase products from arachidonic acid, *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 9, Seite 29-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6283848

- Maas, R. L.; Turk, J.; Oates, J. A. und Brash, A. R. (1982): Formation of a novel dihydroxy acid from arachidonic acid by lipoxygenase-catalyzed double oxygenation in rat mononuclear cells and human leukocytes, *J Biol Chem* 257 [12], Seite 7056-67. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6806263
- Maccarrone, M.; Ranalli, M.; Bellincampi, L.; Salucci, M. L.; Sabatini, S.; Melino, G. und Finazzi-Agro, A. (2000): Activation of different lipoxygenase isozymes induces apoptosis in human erythroleukemia and neuroblastoma cells, *Biochem Biophys Res Commun* 272 [2], Seite 345-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10833416
- Maccarrone, M.; Salucci, M. L.; van Zadelhoff, G.; Malatesta, F.; Veldink, G.; Vliegthart, J. F. und Finazzi-Agro, A. (2001): Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability, *Biochemistry* 40 [23], Seite 6819-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11389595
- Mack, A. J.; Peterman, T. K. und Siedow, J. N. (1987): Lipoxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role, *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 13, Seite 127-54. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3108192
- Maddox, J. F.; Hachicha, M.; Takano, T.; Petasis, N. A.; Fokin, V. V. und Serhan, C. N. (1997): Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor, *J Biol Chem* 272 [11], Seite 6972-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9054386
- Matsumoto, T.; Funk, C. D.; Radmark, O.; Hoog, J. O.; Jornvall, H. und Samuelsson, B. (1988): Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 [1], Seite 26-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2829172
- May, C.; Hohne, M.; Gnau, P.; Schwennesen, K. und Kindl, H. (2000): The N-terminal beta-barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies, *Eur J Biochem* 267 [4], Seite 1100-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10672019
- McNally, A. K.; Chisolm, G. M., 3rd; Morel, D. W. und Cathcart, M. K. (1990): Activated human monocytes oxidize low-density lipoprotein by a lipoxygenase-dependent pathway, *J Immunol* 145 [1], Seite 254-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2162888
- Mehrabian, M.; Allayee, H.; Wong, J.; Shi, W.; Wang, X. P.; Shaposhnik, Z.; Funk, C. D.; Lusis, A. J. und Shih, W. (2002): Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice, *Circ Res* 91 [2], Seite 120-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12142344

- Miller, Y. I.; Chang, M. K.; Funk, C. D.; Feramisco, J. R. und Witztum, J. L. (2001): 12/15-lipoxygenase translocation enhances site-specific actin polymerization in macrophages phagocytosing apoptotic cells, *J Biol Chem* 276 [22], Seite 19431-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11278875
- Minor, W.; Steczko, J.; Stec, B.; Otwinowski, Z.; Bolin, J. T.; Walter, R. und Axelrod, B. (1996): Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution, *Biochemistry* 35 [33], Seite 10687-701. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8718858
- Munger, K. A.; Montero, A.; Fukunaga, M.; Uda, S.; Yura, T.; Imai, E.; Kaneda, Y.; Valdivielso, J. M. und Badr, K. F. (1999): Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [23], Seite 13375-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10557328
- Murakami, M.; Austen, K. F. und Arm, J. P. (1995): The immediate phase of c-kit ligand stimulation of mouse bone marrow-derived mast cells elicits rapid leukotriene C4 generation through posttranslational activation of cytosolic phospholipase A2 and 5-lipoxygenase, *J Exp Med* 182 [1], Seite 197-206. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7540649
- Murray, J. J. und Brash, A. R. (1988): Rabbit reticulocyte lipoxygenase catalyzes specific 12(S) and 15(S) oxygenation of arachidonoyl-phosphatidylcholine, *Arch Biochem Biophys* 265 [2], Seite 514-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3138949
- Nadel, J. A.; Conrad, D. J.; Ueki, I. F.; Schuster, A. und Sigal, E. (1991): Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells, *J Clin Invest* 87 [4], Seite 1139-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2010530
- Nassar, G. M.; Morrow, J. D.; Roberts, L. J., 2nd; Lakkis, F. G. und Badr, K. F. (1994): Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes, *J Biol Chem* 269 [44], Seite 27631-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7961680
- Natarajan, R.; Esworthy, R.; Bai, W.; Gu, J. L.; Wilczynski, S. und Nadler, J. (1997): Increased 12-lipoxygenase expression in breast cancer tissues and cells. Regulation by epidermal growth factor, *J Clin Endocrinol Metab* 82 [6], Seite 1790-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9177384
- Natarajan, R. und Nadler, J. (1998): Role of lipoxygenases in breast cancer, *Front Biosci* 3, Seite E81-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9616130
- Nelson, M. J.; Cowling, R. A. und Seitz, S. P. (1994): Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipoxygenase, *Biochemistry* 33 [16], Seite 4966-73. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8161558
- Neuzil, J.; Upston, J. M.; Witting, P. K.; Scott, K. F. und Stocker, R. (1998): Secretory phospholipase A2 and lipoprotein lipase enhance 15-lipoxygenase-induced enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in low-density lipoproteins, *Biochemistry* 37 [25], Seite 9203-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9636068
- Nguyen, T.; Falgoutret, J. P.; Abramovitz, M. und Riendeau, D. (1991): Evaluation of the role of conserved His and Met residues among lipoxygenases by site-directed mutagenesis of recombinant human 5-lipoxygenase, *J Biol Chem* 266 [32], Seite 22057-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1939225
- Nickerson-Nutter, C. L. und Medvedeff, E. D. (1996): The effect of leukotriene synthesis inhibitors in models of acute and chronic inflammation, *Arthritis Rheum* 39 [3], Seite 515-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8607901
- Nie, D.; Hillman, G. G.; Geddes, T.; Tang, K.; Pierson, C.; Grignon, D. J. und Honn, K. V. (1998): Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth, *Cancer Res* 58 [18], Seite 4047-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9751607
- Nugteren, D. H. (1975): Arachidonate lipoxygenase in blood platelets, *Biochim Biophys Acta* 380 [2], Seite 299-307. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=804329
- Ochi, K.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Taniguchi, K. und Miyamoto, T. (1983): Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate, *J Biol Chem* 258 [9], Seite 5754-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6406506
- O'Donnell, V. B.; Spycher, S. und Azzi, A. (1995): Involvement of oxidants and oxidant-generating enzyme(s) in tumour-necrosis-factor-alpha-mediated apoptosis: role for lipoxygenase pathway but not mitochondrial respiratory chain, *Biochem J* 310 (Pt 1), Seite 133-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7646435
- Oliw, E. H. (2002): Plant and fungal lipoxygenases, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, Seite 313-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432926
- Ostareck, D. H.; Ostareck-Lederer, A.; Shatsky, I. N. und Hentze, M. W. (2001): Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining, *Cell* 104 [2], Seite 281-90. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11207368
- Ostareck, D. H.; Ostareck-Lederer, A.; Wilm, M.; Thiele, B. J.; Mann, M. und Hentze, M. W. (1997): mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1

- regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end, *Cell* 89 [4], Seite 597-606.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9160751
- Ostareck-Lederer, A.; Ostareck, D. H.; Standart, N. und Thiele, B. J. (1994): Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region, *Embo J* 13 [6], Seite 1476-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8137829
- Papayianni, A.; Serhan, C. N. und Brady, H. R. (1996): Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells, *J Immunol* 156 [6], Seite 2264-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8690917
- Parthasarathy, S.; Wieland, E. und Steinberg, D. (1989): A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [3], Seite 1046-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2536929
- Paul, A.; Calleja, L.; Vilella, E.; Martinez, R.; Osada, J. und Joven, J. (1999): Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with phenylhydrazine-induced anemia, *Atherosclerosis* 147 [1], Seite 61-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10525126
- Pavlosky, M.A.; Zhang, Y.; Westre, T.E.; Gan, Q. F.; Pavel, E.; Campochiaro, C.; Hedman, B.; Hodgson, K. O. und Solomon, E. I. (1995): Near Infrared Circular Dichroism, Magnetic Circular Dichroism and X-ray Absorption Spectral Comparison of the Non-Heme Ferrous Active Sites of Plant and Mammalian 15-Lipoxygenases., *J Am Chem Soc* 117, Seite 4316-4327.
- Pettifer, R.F. und Hermes, C. (1985): Absolute energy calibration of X-ray radiation from synchrotron sources., *J Appl Crystall* 18, Seite 404-412.
- Pham, C.; Jankun, J.; Skrzypczak-Jankun, E.; Flowers, R. A., 2nd und Funk, M. O., Jr. (1998): Structural and thermochemical characterization of lipoxygenase-catechol complexes, *Biochemistry* 37 [51], Seite 17952-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9922163
- Porta, H. und Rocha-Sosa, M. (2001): Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event?, *Microbiology* 147 [Pt 12], Seite 3199-200. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11739752
- Prigge, S. T.; Boyington, J. C.; Gaffney, B. J. und Amzel, L. M. (1996): Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases, *Proteins* 24 [3], Seite 275-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8778775
- Prigge, S. T.; Gaffney, B. J. und Amzel, L. M. (1998): Relation between positional specificity and chirality in mammalian lipoxygenases, *Nat Struct Biol* 5 [3], Seite 178-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9501907

- Profita, M.; Sala, A.; Riccobono, L.; Paterno, A.; Mirabella, A.; Bonanno, A.; Guerrera, D.; Pace, E.; Bonsignore, G.; Bousquet, J. und Vignola, A. M. (2000): 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicoisatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects, *J Allergy Clin Immunol* 105 [4], Seite 711-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10756220
- Rankin, S. M.; Parthasarathy, S. und Steinberg, D. (1991): Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages, *J Lipid Res* 32 [3], Seite 449-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1906087
- Rapoport, S.; Hartel, B. und Hausdorf, G. (1984): Methionine sulfoxide formation: the cause of self-inactivation of reticulocyte lipoxygenase, *Eur J Biochem* 139 [3], Seite 573-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6421581
- Rapoport, S.; Hartel, B.; Schewe, T. und Kuhn, H. (1986): Hydroperoxyfatty acids inactivate the reticulocyte lipoxygenase independently of a hydroperoxidase reaction, *FEBS Lett* 202 [2], Seite 202-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3087777
- Rapoport, S. M. und Schewe, T. (1986): The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes, *Biochim Biophys Acta* 864 [3-4], Seite 471-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3098292
- Rapoport, S. M.; Schewe, T.; Wiesner, R.; Halangk, W.; Ludwig, P.; Janicke-Hohne, M.; Tannert, C.; Hiebsch, C. und Klatt, D. (1979): The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte, *Eur J Biochem* 96 [3], Seite 545-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=111925
- Rickert, K. W. und Klinman, J. P. (1999): Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: separation of primary and secondary isotope effects, *Biochemistry* 38 [38], Seite 12218-28. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10493789
- Rouzer, C. A.; Matsumoto, T. und Samuelsson, B. (1986): Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 [4], Seite 857-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3006030
- Rouzer, C. A. und Samuelsson, B. (1985): On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [18], Seite 6040-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3929248
- Rouzer, C. A. und Samuelsson, B. (1986): The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase, *FEBS Lett* 204 [2], Seite

- 293-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3089841
- Salzmann, U.; Kuhn, H.; Schewe, T. und Rapoport, S. M. (1984): Pentane formation during the anaerobic reactions of reticulocyte lipoxygenase. Comparison with lipoxygenases from soybeans and green pea seeds, *Biochim Biophys Acta* 795 [3], Seite 535-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6433987
- Sambrock, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Samuelsson, B.; Dahlen, S. E.; Lindgren, J. A.; Rouzer, C. A. und Serhan, C. N. (1987): Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects, *Science* 237 [4819], Seite 1171-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2820055
- Sandstrom, P. A.; Tebbey, P. W.; Van Cleave, S. und Buttke, T. M. (1994): Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency, *J Biol Chem* 269 [2], Seite 798-801. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8288627
- Scarrow, R. C.; Trimitsis, M. G.; Buck, C. P.; Grove, G. N.; Cowling, R. A. und Nelson, M. J. (1994): X-ray spectroscopy of the iron site in soybean lipoxygenase-1: changes in coordination upon oxidation or addition of methanol, *Biochemistry* 33 [50], Seite 15023-35. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7999760
- Schewe, C.; Schewe, T. und Wendel, A. (1994): Strong inhibition of mammalian lipoxygenases by the antiinflammatory seleno-organic compound ebselen in the absence of glutathione, *Biochem Pharmacol* 48 [1], Seite 65-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8043032
- Schewe, T. (1995): Molecular actions of ebselen--an antiinflammatory antioxidant, *Gen Pharmacol* 26 [6], Seite 1153-69. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7590103
- Schewe, T.; Halangk, W.; Hiebsch, C. und Rapoport, S. M. (1975): A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria, *FEBS Lett* 60 [1], Seite 149-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6318
- Schewe, T.; Kroschwald, P.; Kroschwald, A.; Ludwig, P. und Kuhn, H. (1990): The erythroid arachidonate 15-lipoxygenase in rat reticulocytes, *Biomed Biochim Acta* 49 [2-3], Seite S42-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2386527
- Schewe, T.; Kuhn, H. und Rapoport, S. M. (1986): Positional specificity of lipoxygenases and their suitability for testing potential drugs, *Prostaglandins Leukot Med* 23 [2-3], Seite 155-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2386527

[=Citation&list_uids=3094029](#)

Schewe, T.; Rapoport, S. M. und Kuhn, H. (1986): Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58, Seite 191-272. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3087141

Schilstra, M. J.; Veldink, G. A.; Verhagen, J. und Vliegthart, J. F. (1992): Effect of lipid hydroperoxide on lipoxygenase kinetics, *Biochemistry* 31 [33], Seite 7692-9. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1510955

Schneider, C.; Keeney, D. S.; Boeglin, W. E. und Brash, A. R. (2001): Detection and cellular localization of 12R-lipoxygenase in human tonsils, *Arch Biochem Biophys* 386 [2], Seite 268-74. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11368351

Schnurr, K.; Belkner, J.; Ursini, F.; Schewe, T. und Kuhn, H. (1996): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products, *J Biol Chem* 271 [9], Seite 4653-8. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8617728

Schwarz, K. (2000): Untersuchungen zu den strukturellen und mechanistischen Ursachen der Positionsspezifität von Lipoxygenasen., Dissertation, Institut für Biologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.

Schwarz, K.; Borngraber, S.; Anton, M. und Kuhn, H. (1998): Probing the substrate alignment at the active site of 15-lipoxygenases by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. Evidence for an inverse substrate orientation, *Biochemistry* 37 [44], Seite 15327-35. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9799493

Schwarz, K.; Walther, M.; Anton, M.; Gerth, C.; Feussner, I. und Kuhn, H. (2001): Structural basis for lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenating enzyme species by site-directed mutagenesis, *J Biol Chem* 276 [1], Seite 773-9. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11027682

Schwenk, U.; Morita, E.; Engel, R. und Schroder, J. M. (1992): Identification of 5-oxo-15-hydroxy-6,8,11,13-eicosatetraenoic acid as a novel and potent human eosinophil chemotactic eicosanoid, *J Biol Chem* 267 [18], Seite 12482-8. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1618754

Sendobry, S. M.; Cornicelli, J. A.; Welch, K.; Bocan, T.; Tait, B.; Trivedi, B. K.; Colbry, N.; Dyer, R. D.; Feinmark, S. J. und Daugherty, A. (1997): Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties, *Br J Pharmacol* 120 [7], Seite 1199-206. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9105693

Serhan, C. N. (1994): Eicosanoids in leukocyte function, *Curr Opin Hematol* 1 [1], Seite 69-77. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9371262
- Serhan, C. N. (2002): Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, Seite 433-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432935
- Serhan, C. N.; Hamberg, M. und Samuelsson, B. (1984): Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 [17], Seite 5335-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6089195
- Serhan, C. N. und Sheppard, K. A. (1990): Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro, *J Clin Invest* 85 [3], Seite 772-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2155925
- Shankaranarayanan, P.; Chaitidis, P.; Kuhn, H. und Nigam, S. (2001): Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene, *J Biol Chem* 276 [46], Seite 42753-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11509556
- Shappell, S. B.; Boeglin, W. E.; Olson, S. J.; Kasper, S. und Brash, A. R. (1999): 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma, *Am J Pathol* 155 [1], Seite 235-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10393855
- Shappell, S. B.; Gupta, R. A.; Manning, S.; Whitehead, R.; Boeglin, W. E.; Schneider, C.; Case, T.; Price, J.; Jack, G. S.; Wheeler, T. M.; Matusik, R. J.; Brash, A. R. und Dubois, R. N. (2001): 15S-Hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells, *Cancer Res* 61 [2], Seite 497-503. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11212240
- Shen, J.; Herderick, E.; Cornhill, J. F.; Zsigmond, E.; Kim, H. S.; Kuhn, H.; Guevara, N. V. und Chan, L. (1996): Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development, *J Clin Invest* 98 [10], Seite 2201-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8941635
- Shimizu, T.; Radmark, O. und Samuelsson, B. (1984): Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 [3], Seite 689-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6322165
- Shureiqi, I.; Wojno, K. J.; Poore, J. A.; Reddy, R. G.; Moussalli, M. J.; Spindler, S. A.; Greenson, J. K.; Normolle, D.; Hasan, A. A.; Lawrence, T. S. und Brenner, D. E. (1999): Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers, *Carcinogenesis* 20 [10], Seite 1985-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10534444

[=Citation&list_uids=10506115](#)

- Sies, H. (1994): Ebselen: a glutathione peroxidase mimic, *Methods Enzymol* 234, Seite 476-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7808321
- Sigal, E.; Craik, C. S.; Highland, E.; Grunberger, D.; Costello, L. L.; Dixon, R. A. und Nadel, J. A. (1988): Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoxygenase, *Biochem Biophys Res Commun* 157 [2], Seite 457-64. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3202857
- Sigal, E.; Grunberger, D.; Craik, C. S.; Caughey, G. H. und Nadel, J. A. (1988): Arachidonate 15-lipoxygenase (omega-6 lipoxygenase) from human leukocytes. Purification and structural homology to other mammalian lipoxygenases, *J Biol Chem* 263 [11], Seite 5328-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3356688
- Sigal, E. und Nadel, J. A. (1988): Arachidonic acid 15-lipoxygenase and airway epithelium. Biologic effects and enzyme purification, *Am Rev Respir Dis* 138 [6 Pt 2], Seite S35-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3202520
- Simon, T. C.; Makheja, A. N. und Bailey, J. M. (1990): Relationship of vascular 15-lipoxygenase induction to atherosclerotic plaque formation in rabbits, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 41 [4], Seite 273-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2077542
- Skrzypczak-Jankun, E.; Amzel, L. M.; Kroa, B. A. und Funk, M. O., Jr. (1997): Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme, *Proteins* 29 [1], Seite 15-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9294864
- Skrzypczak-Jankun, E.; Bross, R. A.; Carroll, R. T.; Dunham, W. R. und Funk, M. O., Jr. (2001): Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase, *J Am Chem Soc* 123 [44], Seite 10814-20. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11686682
- Sloane, D. L.; Browner, M. F.; Dauter, Z.; Wilson, K.; Fletterick, R. J. und Sigal, E. (1990): Purification and crystallization of 15-lipoxygenase from rabbit reticulocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 173 [2], Seite 507-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2260964
- Sloane, D. L.; Leung, R.; Barnett, J.; Craik, C. S. und Sigal, E. (1995): Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity, *Protein Eng* 8 [3], Seite 275-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7479689
- Sloane, D. L.; Leung, R.; Craik, C. S. und Sigal, E. (1991): A primary determinant for lipoxygenase positional specificity, *Nature* 354 [6349], Seite 149-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17479689

[=Citation&list_uids=1944593](#)

- Smith, R. L. und Weidemann, M. J. (1980): Reactive oxygen production associated with arachidonic acid metabolism by peritoneal macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 97 [3], Seite 973-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6781503
- Solomon, E. I.; Zhou, J.; Neese, F. und Pavel, E. G. (1997): New insights from spectroscopy into the structure/function relationships of lipoxygenases, *Chem Biol* 4 [11], Seite 795-808. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9384534
- Spanbroek, R.; Stark, H. J.; Janssen-Timmen, U.; Kraft, S.; Hildner, M.; Andl, T.; Bosch, F. X.; Fusenig, N. E.; Bieber, T.; Radmark, O.; Samuelsson, B. und Habenicht, A. J. (1998): 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [2], Seite 663-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9435249
- Spindler, S. A.; Sarkar, F. H.; Sakr, W. A.; Blackburn, M. L.; Bull, A. W.; LaGattuta, M. und Reddy, R. G. (1997): Production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) by prostate tumors and cell lines, *Biochem Biophys Res Commun* 239 [3], Seite 775-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9367845
- Su, C. und Oliw, E. H. (1998): Manganese lipoxygenase. Purification and characterization, *J Biol Chem* 273 [21], Seite 13072-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9582345
- Sun, D. und Funk, C. D. (1996): Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein, *J Biol Chem* 271 [39], Seite 24055-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8798642
- Sun, D.; McDonnell, M.; Chen, X. S.; Lakkis, M. M.; Li, H.; Isaacs, S. N.; Elsea, S. H.; Patel, P. I. und Funk, C. D. (1998): Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment, *J Biol Chem* 273 [50], Seite 33540-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9837935
- Suzuki, H.; Kishimoto, K.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Kanai, F.; Ebina, Y.; Miyatake, A. und Tanabe, T. (1994): Site-directed mutagenesis studies on the iron-binding domain and the determinant for the substrate oxygenation site of porcine leukocyte arachidonate 12-lipoxygenase, *Biochim Biophys Acta* 1210 [3], Seite 308-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8305485
- Takahashi, Y.; Glasgow, W. C.; Suzuki, H.; Taketani, Y.; Yamamoto, S.; Anton, M.; Kuhn, H. und Brash, A. R. (1993): Investigation of the oxygenation of phospholipids by the porcine leukocyte and human platelet arachidonate 12-lipoxygenases, *Eur J Biochem* 218 [1], Seite 165-71. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8305485

[=Citation&list_uids=8243462](#)

- Takahashi, Y.; Reddy, G. R.; Ueda, N.; Yamamoto, S. und Arase, S. (1993): Arachidonate 12-lipoxygenase of platelet-type in human epidermal cells, *J Biol Chem* 268 [22], Seite 16443-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8344930
- Takahashi, Y.; Ueda, N. und Yamamoto, S. (1988): Two immunologically and catalytically distinct arachidonate 12-lipoxygenases of bovine platelets and leukocytes, *Arch Biochem Biophys* 266 [2], Seite 613-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3190246
- Takasago, T.; Peters, E. E.; Graham, D. I.; Masayasu, H. und Macrae, I. M. (1997): Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion, *Br J Pharmacol* 122 [6], Seite 1251-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9401794
- Tang, D. G.; Chen, Y. Q. und Honn, K. V. (1996): Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [11], Seite 5241-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8643560
- Tang, D. G. und Honn, K. V. (1997): Apoptosis of W256 carcinosarcoma cells of the monocytoid origin induced by NDGA involves lipid peroxidation and depletion of GSH: role of 12-lipoxygenase in regulating tumor cell survival, *J Cell Physiol* 172 [2], Seite 155-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9258337
- Tang, D. G.; Renaud, C.; Stojakovic, S.; Diglio, C. A.; Porter, A. und Honn, K. V. (1995): 12(S)-HETE is a mitogenic factor for microvascular endothelial cells: its potential role in angiogenesis, *Biochem Biophys Res Commun* 211 [2], Seite 462-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7540838
- Tang, S.; Bhatia, B.; Maldonado, C. J.; Yang, P.; Newman, R. A.; Liu, J.; Chandra, D.; Traag, J.; Klein, R. D.; Fischer, S. M.; Chopra, D.; Shen, J.; Zhau, H. E.; Chung, L. W. und Tang, D. G. (2002): Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells, *J Biol Chem* 277 [18], Seite 16189-201. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11839751
- Tappel, A.L. (1953): Linoleate oxidation catalysts occurring in animal tissues., *Food Res* 18, Seite 104-108.
- Theorell, H.; Holman, R.T. und Akeson, A (1947): Crystalline Lipoxygenase., *Acta Chem Scand* 1, Seite 571-576.
- Thiele, B. J.; Andree, H.; Hohne, M. und Rapoport, S. M. (1982): Lipoxygenase mRNA in rabbit reticulocytes. Its isolation, characterization and translational repression, *Eur J Biochem* 129 [1], Seite 133-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6819138

- Thomas, C. E. und Jackson, R. L. (1991): Lipid hydroperoxide involvement in copper-dependent and independent oxidation of low density lipoproteins, *J Pharmacol Exp Ther* 256 [3], Seite 1182-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2005580
- Thomas, J. P.; Geiger, P. G. und Girotti, A. W. (1993): Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide- and iron-mediated reactions, *J Lipid Res* 34 [3], Seite 479-90. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8468531
- Thomas, J. P.; Maiorino, M.; Ursini, F. und Girotti, A. W. (1990): Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides, *J Biol Chem* 265 [1], Seite 454-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2294113
- Timar, J.; Silletti, S.; Bazaz, R.; Raz, A. und Honn, K. V. (1993): Regulation of melanoma-cell motility by the lipoxygenase metabolite 12-(S)-HETE, *Int J Cancer* 55 [6], Seite 1003-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8253518
- Trebus, F.; Heydeck, D.; Schimke, I.; Gerth, C. und Kuhn, H. (2002): Transient experimental anemia in cholesterol-fed rabbits induces systemic overexpression of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase and protects from aortic lipid deposition, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67 [6], Seite 419-28. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12468263
- Turk, J.; Maas, R. L.; Brash, A. R.; Roberts, L. J., 2nd und Oates, J. A. (1982): Arachidonic acid 15-lipoxygenase products from human eosinophils, *J Biol Chem* 257 [12], Seite 7068-76. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6806264
- Ueda, N. und Yamamoto, S. (1988): The 6R-oxygenase activity of arachidonate 5-lipoxygenase purified from porcine leukocytes, *J Biol Chem* 263 [4], Seite 1937-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3338999
- Ulbricht, B.; Hagmann, W.; Ebert, W. und Spiess, E. (1996): Differential secretion of cathepsins B and L from normal and tumor human lung cells stimulated by 12(S)-hydroxy-eicosatetraenoic acid, *Exp Cell Res* 226 [2], Seite 255-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8806429
- Ullrich, V.; Weber, P.; Meisch, F. und von Appen, F. (1996): Ebselen-binding equilibria between plasma and target proteins, *Biochem Pharmacol* 52 [1], Seite 15-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8678900
- van Leyen, K.; Duvoisin, R. M.; Engelhardt, H. und Wiedmann, M. (1998): A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation, *Nature* 395 [6700], Seite 392-5. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759730
- Van Os, C. P.; Rijke-Schilder, G. P.; Van Halbeek, H.; Verhagen, J. und Vliegenthart, J. F. (1981): Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1. Kinetics and regio-stereo specificities of the reaction steps, *Biochim Biophys Acta* 663 [1], Seite 177-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6783108
- Vanderhoek, J. Y.; Bryant, R. W. und Bailey, J. M. (1980): Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid, *J Biol Chem* 255 [21], Seite 10064-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6253463
- Verhagen, J.; Veldink, G. A.; Egmond, M. R.; Vliegenthart, J. F.; Boldingh, J. und van der Star, J. (1978): Steady-state kinetics of the anaerobic reaction of soybean lipoxygenase-1 with linoleic acid and 13-L-hydroperoxylinoleic acid, *Biochim Biophys Acta* 529 [3], Seite 369-79. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=96861
- Watanabe, T. und Haeggstrom, J. Z. (1993): Rat 12-lipoxygenase: mutations of amino acids implicated in the positional specificity of 15- and 12-lipoxygenases, *Biochem Biophys Res Commun* 192 [3], Seite 1023-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8507177
- Watanabe, T.; Medina, J. F.; Haeggstrom, J. Z.; Radmark, O. und Samuelsson, B. (1993): Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain, *Eur J Biochem* 212 [2], Seite 605-12. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8444196
- Webb, E.C. (1992): Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classifications of enzymes., *Enzyme Nomenclature*, Acad Press, San Diego.
- Wiesner, R.; Suzuki, H.; Walther, M.; Yamamoto, S. und Kuhn, H. (2003): Suicidal inactivation of the rabbit 15-lipoxygenase by 15S-HpETE is paralleled by covalent modification of active site peptides, *Free Radic Biol Med* 34 [3], Seite 304-15. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12543246
- Williams, S. E.; Inoue, I.; Tran, H.; Fry, G. L.; Pladet, M. W.; Iverius, P. H.; Lalouel, J. M.; Chappell, D. A. und Strickland, D. K. (1994): The carboxyl-terminal domain of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP, *J Biol Chem* 269 [12], Seite 8653-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7510694
- Woods, J. W.; Coffey, M. J.; Brock, T. G.; Singer, II und Peters-Golden, M. (1995): 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation, *J Clin Invest* 95 [5], Seite 2035-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7510694

[=Citation&list_uids=7738170](#)

Yamamoto, S. (1989): Mammalian lipoxygenases: molecular and catalytic properties, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 35 [4], Seite 219-29. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2497473

Yamamoto, S. (1991): "Enzymatic" lipid peroxidation: reactions of mammalian lipoxygenases, Free Radic Biol Med 10 [2], Seite 149-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1901823

Yamamoto, S. (1992): Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions, Biochim Biophys Acta 1128 [2-3], Seite 117-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1420284

Yamashita, H.; Nakamura, A.; Noguchi, N.; Niki, E. und Kuhn, H. (1999): Oxidation of low density lipoprotein and plasma by 15-lipoxygenase and free radicals, FEBS Lett 445 [2-3], Seite 287-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10094474

Yla-Herttuala, S.; Rosenfeld, M. E.; Parthasarathy, S.; Glass, C. K.; Sigal, E.; Witztum, J. L. und Steinberg, D. (1990): Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions, Proc Natl Acad Sci U S A 87 [18], Seite 6959-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1698286

Yokoyama, C.; Shinjo, F.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Oates, J. A. und Brash, A. R. (1986): Arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes by immunoaffinity chromatography and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids, J Biol Chem 261 [35], Seite 16714-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3782139

Yoshimoto, T.; Suzuki, H.; Yamamoto, S.; Takai, T.; Yokoyama, C. und Tanabe, T. (1990): Cloning and sequence analysis of the cDNA for arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocytes, Proc Natl Acad Sci U S A 87 [6], Seite 2142-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2315307

Yoshimoto, T.; Suzuki, H.; Yamamoto, S.; Takai, T.; Yokoyama, C. und Tanabe, T. (1991): Cloning and expression of arachidonate 12-lipoxygenase cDNA from porcine leukocytes, Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 21A, Seite 29-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1825555

Zhang, Y. Y.; Radmark, O. und Samuelsson, B. (1992): Mutagenesis of some conserved residues in human 5-lipoxygenase: effects on enzyme activity, Proc Natl Acad Sci U S A 89 [2], Seite 485-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1731317

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Nutzung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erarbeitet und verfasst zu haben.

Berlin, 24. Februar 2003

Tabellarischer Lebenslauf

Name Matthias Walther
e-mail matthiaswalther@yahoo.de

Geburtsdatum, -ort 20. Juni 1970 in Berlin

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Schulausbildung 1976 - 1982 Henry-Dunant-Grundschule in Berlin
1982 - 1989 Paulsen-Gymnasium in Berlin,
Abschluß Abitur

Studium 10/89 Beginn des Studiums der Chemie an der TU-Berlin
04/92 Abschluß des Vordiploms
03/94-09/94 Industriepraktikum bei Astra Hässle AB, Schweden
09/95-01/97 Tätigkeit als stud. Hilfskraft am Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie der TU-Berlin
01/97 Abschluß als Diplom-Chemiker mit der Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur Cyclisierungsreaktion bei Peptidsynthetasen“ bei Priv.-Doz. Dr. Rainer Zocher und Prof. Horst Kleinkauf, Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, TU-Berlin

Promotion seit 08/97 Promotionsarbeit am Institut für Biochemie der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartmut Kühn
06/01-08/01 Forschungsaufenthalt am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Wiedmann

Publikationen

Tagungsbeiträge

Glinski, M., **Walther, M.** & Zocher, R. (1996): "Cyclosporin synthetase: Kinetic measurements of the binding sites of D-Ala, L-Ala, and L-Leu." Frühjahrstagung der VAAM, 24.-27.03.1996, Bayreuth, Deutschland

Glinski, M., **Walther, M.** & Zocher, R. (1996): "Cyclosporin Synthetase: Kinetic Analysis of Cyclo-(D-Ala-MeLeu) and Cyclo-(L-Ala-MeLeu) Formation and Studies on the Mechanism of Cyclosporin Biosynthesis." Symposium: Enzymology of Biosynthesis of Natural Products, 22.-25.09.1996, Berlin, Deutschland

Walther, M., Ivanov, I. & Kühn, H. (2000): "Oxygenation of omega-branched fatty acids by wild-type and mutant rabbit 15-lipoxygenase species." 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research, 04.-08.06.2000, Florenz, Italien

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Hornung, E., **Walther, M.**, Kühn, H. & Feussner, I. (1999): "Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis." Proc Natl Acad Sci **96**: 4192-4197.

Kühn, H., Kuban, R., **Walther, M.** & Veldink, G. A. (1999): "X-ray absorption studies into the iron ligand sphere of plant and animal lipoxygenases." Adv Exp Med Biol **469**: 99-104.

Walther, M., Holzhütter, H. G., Kuban, R. J., Wiesner, R., Rathmann, J. & Kühn, H. (1999): "The inhibition of mammalian 15-lipoxygenases by the anti-inflammatory drug ebselen: dual-type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere." Mol Pharmacol **56**: 196-203.

Schwarz, K., **Walther, M.**, Anton, M., Gerth, C., Feussner, I. & Kühn, H. (2001): "Structural basis for lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenating enzyme species by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **276**: 773-779.

Walther, M., Ivanov, I., Myagkova, G. & Kühn, H. (2001): "Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis." Chem Biol **8**: 779-790.

Walther, M., Anton, M., Wiedmann, M., Fletterick, R. & Kühn, H. (2002): "The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding." J Biol Chem **277**: 27360-27366.

Kühn, H., **Walther, M.** & Kuban, R.-J. (2002): "Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases: structure, function, and biological implications." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 263-290.

Wiesner, R., Suzuki, H., **Walther, M.**, Yamamoto, S. & Kühn, H. (2003): "Suicidal inactivation of the rabbit 15-lipoxygenase by 15S-HpETE is paralleled by covalent modification of active site peptides." Free Rad Biol Med **34**: 304-315.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Hartmut Kühn für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung. Seine Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft trugen entscheidend zum Gelingen der Arbeit bei.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Kühn für die gute Atmosphäre und die Kooperationsbereitschaft bedanken. Insbesondere gilt mein Dank:

Frau Monika Anton für die Unterstützung bei den täglichen Laborarbeiten,

Frau Christa Gerth für die Präparation der nativen Kaninchen-Retikulozyten 15-LOX sowie rekombinanter 5-LOX-Mutanten,

Herrn Pavlos Chaitidis für die Hilfe bei der densitometrischen Auswertung

und Dr. Rainer Wiesner und Jörg Rathmann für die Durchführung der EXAFS-Messungen.

Darüber hinaus danke ich

Dr. Ralf-Jürgen Kuban für die Einführung in die Strukturmodellierung und die EXAFS-Auswertung,

Dr. Igor Ivanov für die Synthese der artifiziellen Fettsäuren,

Jörg Rathmann und Dr. I. Ivanov für die Unterstützung bei den GC/MS-Untersuchungen,

Dr. Hermann-Georg Holzhütter für die Modellrechnungen zum Hemmmechanismus von Ebselen,

Dr. Kerstin Schnurr für die SMP-Präparationen und

Dr. Martin Wiedmann für die EKRM-Präparation und wertvolle Tipps für die Proteinreinigung (Nicht kleckern, klotzen!).

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit.